

**INCREMENTO DEL CONTENIDO EN COMPONENTES
BIO-ACTIVOS (ERGOSTEROL) EN HONGOS
COMESTIBLES MEDIANTE SUPLEMENTACIÓN
DIRIGIDA DEL MEDIO DE CULTIVO Y COMPOST.**

Aplicación al caso del champiñón (*Agaricus bisporus*)



**Memoria presentada para optar al Título de
Doctor por la Universidad de Sevilla.**

Gonzalo Falcón García.

Departamento de Microbiología y Parasitología.

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019.



Miguel Ángel Caviedes Formento, Catedrático de Universidad de Microbiología de la Universidad de Sevilla, Director del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla.

Informa:

Que la tesis doctoral titulada **“INCREMENTO DEL CONTENIDO EN COMPONENTES BIO-ACTIVOS (ERGOSTEROL) EN HONGOS COMESTIBLES MEDIANTE SUPLEMENTACIÓN DIRIGIDA DEL MEDIO DE CULTIVO Y COMPOST. Aplicación al caso del champiñón (*Agaricus bisporus*)”**, presentada por el doctorando **Gonzalo Falcón García**, para optar por el título de **Doctor por la Universidad de Sevilla**, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Drs.: **Juan Dionisio Bautista Palomas** e **Ignacio D. Rodríguez Llorente**, reuniendo todo los requisitos necesarios para presentarse a su defensa.

Fdo: Miguel Ángel Caviedes Formento
(Director del Departamento de Microbiología y Parasitología).



Juan Dionisio Bautista Palomas, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A055-5159678268), e **Ignacio D. Rodríguez Llorente**, Profesor Titular de Universidad de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla (NRP: A0504-0919238935), adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y al Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla, respectivamente.

Informan:

Que la Tesis Doctoral titulada **“INCREMENTO DEL CONTENIDO EN COMPONENTES BIO-ACTIVOS (ERGOSTEROL) EN HONGOS COMESTIBLES MEDIANTE SUPLEMENTACIÓN DIRIGIDA DEL MEDIO DE CULTIVO Y COMPOST”**. Aplicación al caso del champiñón (*Agaricus bisporus*)”, realizada por Gonzalo Falcón García para optar al título de **Doctor por la Universidad de Sevilla**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología (Facultad de Farmacia), Universidad de Sevilla. Y que dicha tesis reúne todos los requisitos académicos y experimentales necesarios para proceder a su presentación y defensa.

Fdo.: Dr. Juan Dionisio Bautista Palomas

Fdo.: Dr. Ignacio D. Rodríguez Llorente

(Director de Tesis)

(Director de Tesis)

Agradecimientos

A los departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y Microbiología y Parasitología de la facultad de Farmacia, por ofrecerme la posibilidad de realizar este trabajo.

A Juan Dionisio Bautista Palomas, por guiarme todos estos años con infinita paciencia e introducirme en el interesante mundo de la investigación. Por convertirse en un mentor atento y en un ejemplo a seguir como profesional y como persona.

A Ignacio David Rodríguez Llorente, por el apoyo y los consejos a lo largo de todos estos años.

A Rut, Mercedes y Miguel Ángel, del departamento de Química analítica, A Isabel del departamento de Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, a José Antonio del H.U. Valme y a Sebastián del Instituto de Biomedicina de Sevilla porque sin la ayuda prestada no habría podido sacar este proyecto adelante.

A mis compañeros de los que tanto he aprendido como investigador y como persona. A Pilar por no doblegarse ante las dificultades y seguir luchando incansablemente por lo que realmente importa. A Anabel y Renato por tener el valor de abrirse camino allá a donde estén

A mi familia. Por la paciencia y el apoyo constante que me ha permitido llegar hasta donde estoy.

A Alicia. Por alegrarme cada día como solo ella sabe hacer y darme ánimos para seguir adelante cuando se acumulaban las dificultades. Por la energía para ir más allá que me da cada sonrisa. Por cambiarme la vida.

En memoria de Luis. Gracias por todo.

Índice.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES históricos: Breve historia de los hongos comestibles	1
1.2. Los hongos: generalidades	6
1.3. Los hongos comestibles; interés económico y nutricional.	12
1.3.1. Hongos comestibles silvestres y cultivables	12
1.3.2. Interés económico del cultivo de hongos comestibles	13
1.3.2.1. Producción a escala mundial	15
1.3.2.2 Distribución por países	16
1.3.2.3. Localización de la producción en España	17
1.3.3. Interés nutricional	18
1.3.3.1. Hidratos de carbono	21
1.3.3.2. Proteínas	22
1.3.3.3. Lípidos	25
1.3.3.4. Vitaminas hidrosolubles	29
1.3.3.5. Ácidos orgánicos y compuestos fenólicos	31
1.3.3.6. Minerales	33
1.3.3.7. Flavonoides. ¿Productores o Bioacumuladores?	34
1.4. LOS HONGOS COMO FUENTE DE ALIMENTOS FUNCIONALES	35
1.5. ERGOSTEROL Y VITAMINA D	41
1.5.1 Biosíntesis de ergosterol	41
1.5.2 Aplicaciones del ergosterol; diana molecular, propiedades medicinales y precursor de nutraceuticos	44
1.5.3 Vitamina D	45
1.5.3.1 Ergocalciferol y colecalciferol	45
1.5.3.2 Metabolismo de la Vitamina D	48
1.5.3.3 Importancia clínica de la Vitamina D	49
1.5.3.4 Fuentes alimentarias de Vitamina D	52
1.5.3.5 Uso de hongos comestibles como fuente de Vitamina D	54
2. OBJETIVOS	57
3. MATERIALES Y METODOS	61
3.1. REACTIVOS Y EQUIPOS	63
3.2. MICROORGANISMO	69
3.3. SUBPRODUCTOS Y SUPLEMENTOS	69

3.3.1.	Harina de Alperujo (HALP).....	71
3.3.2.	Harina de Hoja de Olivo (HHO).....	72
3.3.3.	Extracto de Hoja de Olivo (EHO)	72
3.3.4.	Harina de Tallo de Champiñón (HTCH).....	73
3.3.5.	Fracción Quitina/Glucanos (F-Q/G).....	74
3.3.6.	Líquido de escaldado concentrado 10x (LE-10x).....	75
3.4.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUPLEMENTOS.....	76
3.4.1.	Humedad	76
3.4.2.	Hidratos de carbono totales.....	76
3.4.3.	Grasa total	77
3.4.4.	N-total y Proteína total.	77
3.4.5.	Composición aminoacídica (aminograma)	78
3.4.6.	Polifenoles totales	80
3.4.7.	Cenizas totales.....	80
3.4.8.	Monosacáridos, oligosacáridos y polialcoholes.	81
3.4.9.	Polisacáridos Fácilmente Hidrolizables (PSFH).....	81
3.4.10.	Polisacáridos Difícilmente Hidrolizables (PSDH)	82
3.4.11.	Glucanos	83
3.4.12.	Quitina.....	84
3.5.	MEDIOS DE CULTIVO PARA CRECER A. <i>BISPORUS</i>	85
3.5.1.	Medio Líquido mínimo definido: MLmd.....	85
3.5.2.	Medio Sólido mínimo definido agar: MSmd-agar	86
3.5.3.	Preparación de compost	86
3.5.3.1.	<i>Compostaje</i>	86
3.5.3.2.	Compost mínimo	87
3.5.3.3.	Compost de producción	88
3.5.3.4.	Tierra de cobertura	88
3.6.	CONDICIONES DE CRECIMIENTO	88
3.6.1.	Crecimiento en MLmd y MSmd-agar	88
3.6.1.1.	Medio Líquido mínimo definido - MLmd.....	88
3.6.1.2.	Medio Sólido mínimo definido en Agar - MSmd- agar.....	89
3.6.2.	Crecimiento en sacas de compost.....	90
3.6.2.1.	Preparación de micelio: granos de trigo.	90
3.6.2.2.	Cámara de cultivo.....	91

3.6.2.3.	Inóculo.....	92
3.6.2.4.	Incubación / Colonización	92
3.6.2.5.	Fructificación; tierra de cobertura y condiciones de fructificación.	93
3.7.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS	95
3.7.1.	Cosecha	96
3.7.2.	Tratamiento Ultravioleta.....	97
3.7.2.1.	Cámara de irradiación ultravioleta.....	97
3.7.2.2.	Condiciones del tratamiento.....	99
3.7.2.3.	Liofilizado	100
3.8.	EXTRACCIÓN ERGOSTEROL Y VITAMINA D2.....	101
3.8.1.	Extracción con solvente orgánico.....	102
3.8.2.	Reconstitución de la muestra.....	103
3.8.3.	Análisis HPLC-Masa	103
3.9.	ENSAYO DE SOBREENPRESIÓN/INDUCCIÓN DE LA RUTA DE ERG.....	104
3.9.1.	Obtención de los anticuerpos.	104
3.9.2.	Preparación del extracto homogeneizado.	105
3.9.3.	Western-blot	105
3.9.3.1.	Electroforesis en PAGE-SDS.....	106
3.9.3.2.	Transferencia a membrana PVDF.....	108
3.9.3.3.	Incubación con anticuerpo primario.	110
3.9.3.4.	Incubación con anticuerpo secundario.	110
3.9.3.5.	Visualización y procesado de imagen.....	111
3.9.4.	Dot-Blot	111
3.10.	TOXICIDAD.....	111
3.10.1.	Animales.....	111
3.10.2.	Toxicidad aguda.....	112
3.10.3.	Toxicidad subcrónica	113
3.10.4.	Análisis de parámetros sanguíneos.....	114
3.11.	BIOACCESIBILIDAD.....	116
3.12.	Biodisponibilidad.....	118
3.13.	Análisis estadístico	120
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.1.	PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUPLEMENTOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES.....	124

4.1.1.	Recopilación de sub-productos.....	124
4.1.2.	Preparación de los suplementos.....	125
4.1.3.	Caracterización de los suplementos.....	127
4.1.3.1.	Harina de Alperujo (HALP).....	128
4.1.3.2.	Harina de hoja de olivo (HHO).....	128
4.1.3.3.	Extracto de hoja de olivo (EHO)	128
4.1.3.4.	Harina de tallos de champiñón (HTCH)	128
4.1.3.5.	Fracción enriquecida en quitina/glucanos (F-Q/G)	129
4.1.3.6.	Líquido de escaldado concentrado 10 veces (LE-10x).....	129
4.2.	EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO/COMPOST DE <i>AGARICUS BISPORUS</i> CON DIFERENTES SUPLEMENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE ERGOSTEROL EN MICELIO Y EN CUERPOS FRUCTÍFEROS.	129
4.2.1.	Cultivos en medio líquido mínimo definido (MLmd)	130
4.2.2.	Cultivos en medio sólido mínimo definido/Agar (MSmd/Agar).....	135
4.2.3.	Cultivos en medio sólido mínimo definido/Compost (MSmd/Compost).....	138
4.3.	COMPOSICIÓN QUÍMICO-NUTRICIONAL DE CHAMPIÑONES CRECIDOS EN MSmd/COMPOST SUPLEMENTADO CON HTCH O HHO.....	143
4.4.	SOBRE-EXPRESIÓN DE ENZIMAS CLAVES DE LA VÍA BIOSINTÉTICA DEL ERGOSTEROL EN HONGOS.....	152
4.5.	fotoCONVERSIÓN DEL ERGOSTEROL EN VITAMINA-D2 POR IRRADIACIÓN-UV DE CHAMPIÑONES POST-COSECHA.....	160
4.5.1.	Estudios preliminares a distintas λ	161
4.5.2.	Efecto de la humedad sobre la fotoconversión.	162
4.5.3.	Efecto de la temperatura sobre la fotoconversión	163
4.5.4.	Efecto de la orientación y geometría sobre la fotoconversión	164
4.6.	CINÉTICA DE LA fotoCONVERSIÓN DEL ERGOSTEROL EN VITAMINA-D2 POR IRRADIACIÓN UVB.....	168
4.6.1.	Cinética de la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2.....	168
4.6.2.	Modelo cinético de la fotoconversión del ergosterol	169
4.6.3.	Parámetros cinéticos del modelo.....	170
4.7.	EFFECTO COMBINADO DE LA HUMEDAD Y LA TEMPERATURA DE IRRADIACIÓN SOBRE LA fotoCONVERSIÓN DEL ERGOSTEROL EN VITAMINA-D2.	171
4.8.	TOXICIDAD, BIACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE LA VITAMINA-D2 EN CHAMPIÑONES (<i>Agaricus bisporus</i>) crecidos en compost suplementado con HTCH o HHO e IRRADIADOS CON LUZ-UVB.	172
4.8.1.	Toxicidad	172

4.8.2.	Bioaccesibilidad	182
4.8.3.	Biodisponibilidad	183
5.	CONCLUSIONES	187
6.	BIBLIOGRAFÍA	193

ABREVIATURAS

1,25 (OH)₂ D – 1, 25 dihidroxi vitamina D

7 DHC – 7 dehidrocolesterol

25 (OH) D – 25 Hidroxivitamina D

AAsA – Aminoácidos aromáticos

AAsCP – Aminoácidos con carga positiva

AAsCN – Aminoácidos con carga negativa

AAsE – Aminoácidos esenciales

AAsH – Aminoácidos hidrofóbicos

AAsR – Aminoácidos ramificados

AAsS – Aminoácidos azufrados

ADNr – Ácido Desoxiribonucleico ribósomico

Ags – Ácidos grasos

AOAC – “*Association of Official Analytical Chemist*” - Asociación Oficial de Químicos Analíticos

ALB - Albumina

ALP - Alperujo

ALT – Alanina transaminasa

APS – Persulfato Amónico

ARNm – Ácido Ribonucleico mensajero

AST – Aspartato transaminasa

ATP – Adenosin Trifosfato

AU – Ácido úrico

BAS – Basófilos

BT – Bilirrubina total

CCMH – Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina

C/N – Carbono/ Nitrógeno

CITIUS – Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla

CK - Creatinina quinasa

CREA - Creatinina

CT – Colesterol total

DDR – Dosis Diaria Recomendada

DL₅₀ – Dosis Letal 50

DMEM – “*Dubelcco’s Modified Eagle’s Medium*” – Medio de Eagle Modificado de Duplecco

DTT - Dithiothreitol

EFSA – “*European Food Safety Authority*” – Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EHO – Extracto de Hoja de Olivo

EOS - Eosinófilos

ERG - Ergosterol

ERG-SH – Ergotioneina

F-Q/G – Fracción Quitina/Glucanos

FA – Fosfatasa alcalina

FAO – “*Food and Agriculture Organization*” – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FAOSTAT – “*Food and Agriculture Organization Statistics*” – División de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FBS – “*Fetal Bovine Serum*” – Suero Fetal Bovino

FDA – “*Food and Drugs Administration*” – Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FUFOSE – *Functional Foods Science in Europe* – Comisión sobre la Ciencia en los Alimentos Funcionales en Europa

CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropil) dimetilammonio]-1-propanesulfonato hidrato

GHS – “*Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals*” - Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos

GLB - Globulina

GLUC - Glucosa

GRAS – “*Generally Recognized As Safe*” – Reconocido Generalmente como Seguro

GST – Glutación S-transferasa

H₂O₂ – Peróxido de hidrogeno

H₂O_d – Agua destilada

HALP – Harina de Alperujo

Hb - Hemoglobina

HCM – Hemoglobina corpuscular media

HEM - Hematíes

HEPES – ácido 4-Hidroxietil-1-piperazinetano sulfónico.

HHO – Harina Hoja de Olivo

HMG-CoA – 3-Hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A

HMT - Hematocrito

HO – Hoja de Olivo

HPLC – High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

HTCH – Harina de Tallo de Champiñón

IgG – Inmunoglobulina G

L-DOPA – L-3,4, Dihidroxifenilalanina

LE-10x – Líquido de Escaldado concentrado 10 veces

LDH – Lactato deshidrogenasa

LEU- Leucocitos

LIN - Linfocitos

MLmd – Medio Líquido mínimo definido

MON - Monocitos

MSmd-Agar – Medio Sólido mínimo definido en agar

MSmd-compost – Medio Sólido mínimo definido - Compost

NADPH+H⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato

NEU - Neutrófilos

nLC-MS/MS – “*nano Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry*” – nano-Cromatografía Líquida en tándem con Espectrometría de Masa

NAG – N- Acetilglucosamina

ODA – ácido 10-oxo-transdecanoico

PAGE – Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

PDA – “*Potato Dextrose Agar*” - Agar Dextrosa Patata

PBS – “*Phosphate Buffer Saline*” – Tampón fosfato salino

P.C. – Peso corporal

PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa

P.F. – Peso Fresco

P.H. – Peso Húmedo

PQT - Plaquetas

P.S. – Peso Seco

PSFH – Polisacáridos Fácilmente Hidrolizables

PSDH - Polisacáridos Difícilmente Hidrolizables

PT – Proteína total

PTH – Hormona Paratiroidea

PTM – Potencial Transmembrana

P/V – Peso /Volumen

PVDF – Fluoruro de Polivinilideno

Q-TOF – *Quadruple Time Of Flight Mass Spectrometer* – Espectrometro de masa de tiempo de vuelo con cuádrupolo

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno

RVD – Receptores de Vitamina D

SDS – Dodecilsulfato Sódico

TA- Toxicidad Aguda

TEMED – Tetrametiletilendiamina

TG - Triglicéridos

TP – Tiempo de protrombina

TS-c – Toxicidad subcrónica

TTPA – Tiempo de trombina parcial activada

UPLC – “*Ultra Performance Liquid Chromatography*” – Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento.

US – Universidad de Sevilla

USDA – “*United States Department of Agriculture*” – Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UI – Unidades Internacionales

UV – Ultravioleta

VCM – Volumen Corpuscular Medio

Vit-D2 – Vitamina D2, ergocalciferol

Vit-D3 – Vitamina D3, calciferol

WHO – “*World Health Organization*” – Organización mundial de la Salud

RESUMEN

RESUMEN

Tradicionalmente los hongos han estado vinculados tanto a la alimentación como a la medicina, sin embargo, actualmente y en base a los conocimientos científicos actuales se puede afirmar que ambos campos están fuertemente interconectados. No solo ofrecen un aporte nutricional atractivo de buen sabor y textura, sino que además son candidatos ideales para responder a la demanda creciente de determinados componentes beneficiosos para la salud, como por ejemplo la vitamina D.

Así ante la creciente hipovitaminosis D en la población mundial, incluso en los países con alta radiación solar anual, la demanda de productos ricos naturales en vitamina D está experimentando una creciente demanda. Por lo que, en el presente trabajo, se ha considerado la opción de aprovechar los hongos comestibles, ricos en el precursor de la vitamina D₂, el ergosterol, como alimentos funcionales para suplir esta demanda. No obstante, estudios recientes están revelando que el ergosterol y otros compuestos presentes en los hongos y setas comestibles, y en particular en *A. bisporus*, poseen propiedades bioactivas beneficiosas para la salud que pueden reforzar su candidatura como alimento funcional o como base para la formulación de productos nutracéuticos.

Para ello, en primer lugar se ha estudiado un procedimiento, basado en la suplementación del medio de cultivo o compost, para aumentar el contenido de ergosterol en *A. bisporus*. Con tal fin se ha estudiado el efectos de varios suplementos provenientes de la industria aceitera y del cultivo de champiñón (harina de alperujo, HALP, y harina de tallos de champiñón, HTCH, respectivamente) en una formulación de medio mínimo que permite el crecimiento de *A. bisporus* en medios líquidos y gelificados en agar. Tras seleccionar aquellos suplementos con un impacto significativo en la composición del contenido en ergosterol se comprobó la eficacia en la inducción en compost mínimo siguiendo el procedimiento de cultivo establecido en la industria. Los cultivos obtenidos presentaron un incremento significativo en el contenido en ergosterol respecto a los controles mostrando que es posible alterar la composición en compuestos bioactivos mediante suplementación dirigida del compost. Como confirmación de la inducción de la ruta de biosíntesis del ergosterol se realizó un estudio mediante western-blot en el que se detectaron que tres de las enzimas

implicadas en la ruta: ERG-2, ERG-6 y ERG-11 incrementaban sus niveles de expresión proteica entre 1,85 2,75 y 3,52 veces, respectivamente.

La conversión de ergosterol a vitamina D₂ se llevó a cabo por exposición del ergosterol a una fuente de luz ultravioleta (UVB); estudiándose el tipo de longitud de onda empleada, la temperatura y el contenido en humedad de la biomasa así como la orientación de la fuente de luz ultravioleta que afectan significativamente a la cantidad de vitamina D generada ante una misma dosis de tratamiento. Pese a que los valores óptimos de conversión no coinciden con las condiciones de trabajo habituales en la industria es posible obtener valores de vitamina D₂ que cubran las necesidades diarias de vitamina D con una ración de 100g sin que se alcancen los valores de saturación en los que empiezan a manifestarse compuestos nocivos para la salud (toxiesteroles).

Los champiñones enriquecidos en vitamina D₂, con niveles suficientes para satisfacer la dosis diaria recomendada (15 µg) se han sometido a una evaluación toxicológica por seguridad alimentaria antes de poder considerarse un alimento funcional o la base para productos nutraceuticos. Para ello se comprobó la toxicidad aguda hasta una dosis de 5000 mg/kg de peso corporal y la toxicidad ante exposición prolongada de dosis de 500 mg/kg de peso corporal en ratas no detectándose ningún síntoma característico de efectos adversos debidos a la ingesta ni ninguna muerte; por lo que no se ha podido determinar la DL₅₀ de estos champiñones enriquecidos ni establecer una clasificación de riesgo en la GHS y se requerirán más estudios para confirmar la seguridad total. La Toxicidad sub-cronica también ha revelado la ausencia de efectos adversos tanto a nivel de parámetros sanguíneos (hematológicos, bioquímicos, etc), peso de órganos o análisis histopatológico.

Respecto a la biodisponibilidad de la vitamina D₂ obtenida en *A. bisporus* se ha podido determinar que ante una simulación in vitro del proceso de digestión y de absorción de la fracción micelar en células Caco-2, que aproximadamente el 50% de la vitamina D₂ presente en la biomasa ingerida es capaz de atravesar el epitelio intestinal quedando biodisponible para el organismo.

Así pues, es posible emplear *A. bisporus*, como un alimento funcional *per se*, enriquecido en vitamina D₂. Este incremento de valor añadido se produce sin realizar alteraciones significativas en el proceso de producción industrial, mediante la adición de suplementos provenientes de las industrias aceiteras y del cultivo de champiñón. La

ausencia de toxicidad y la elevada biodisponibilidad son factores esperanzadores en la aceptación de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2 como un alimento funcional que pueda contribuir a satisfacer la demanda creciente de vitamina D.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS: BREVE HISTORIA DE LOS HONGOS COMESTIBLES

El consumo de hongos es una práctica que se viene realizando durante milenios, como muestran indicios en pinturas rupestres de más de 9000 años de antigüedad. Si bien, inicialmente el consumo de estos hongos se debía a prácticas rituales religiosas más que al uso alimentario. La distribución de estos hallazgos a nivel global podría implicar que el consumo de hongos ha estado vinculado a la humanidad desde los mismos inicios de la civilización y que debido a sus características textural, sabor y aroma el hombre primitivo también los usaba como alimento.

Por otro lado, hay evidencias de que los habitantes de estos periodos ancestrales conocían otras aplicaciones de los hongos aparte de su valor nutricional. Ötzi, la momia alpina de 5300 años de antigüedad llevaba en una bolsa con hierbas consideradas medicinales trozos de *Piptoporus betulinus* (hongo del abedul) y *Fomes fomentarius* un hongo comúnmente empleado como yesca para encender fuegos además de poseer propiedades hemostáticas y antibacterianas ([Martel y col., 2017](#); [Niksic y col., 2016](#)).

Además, hay pruebas históricas de que dicho consumo no solo se debía a sus propiedades medicinales, psicotrópicas, y a prácticas rituales, puesto que en el antiguo Egipto los hongos comestibles eran conocidos como "Plantas de la inmortalidad" o "Regalo de Osiris" y se consideraban un manjar reservado a los faraones quedando su consumo vetado al resto de la población.

En la antigua Grecia el consumo de hongos no estaba tan restringido por el estatus social, lo que probablemente conllevó a una mayor exposición de hongos tóxicos a la población y a la consiguiente discusión de si los hongos eran un tipo de planta defectuosa, descrito así por Teofrasto, de la cual se debía evitar el consumo. Tenemos constancia de estos hechos ya que Eurípides narra la intoxicación de varios miembros de una familia tras consumir hongos. No es hasta Dioscórides, considerado uno de los grandes médicos griegos del siglo I, que se marca una distinción entre hongos comestibles y hongos dañinos ([Font quer, 1957](#)). Otros autores griegos consideraban a las setas "hijos de los dioses" debido a la aparición de estas tras las tormentas asumiendo que los relámpagos de Zeus eran portadores de las semillas de los hongos.

Los romanos basaron gran parte de sus conocimientos sobre hongos en los avances adquiridos por los griegos. En el Imperio romano las setas comestibles seguían siendo un manjar muy cotizado, siendo tan populares entre la aristocracia que para muchas especies se acuñó el nombre por el que las conocemos hoy en día p. ej., *Amanita caesarea*. Este interés generó una gran actividad económica basada en la recolección de especies comestibles de modo que un recolector experimentado tenía una gran demanda de clientes y pese a que la recolección continuó siendo el principal método de obtención los romanos prestaron un gran interés a la clasificación, ciclo de vida y cultivo de algunos de estos hongos.

Otro empleo que también se popularizó fue la presencia de catadores durante las cenas, prácticas que intentaban garantizar que el comensal no se envenenase accidentalmente. El asesinato del emperador Claudio por su esposa Agripina al introducir un trozo de *Amanita phalloides* en su plato muestra que no solamente sabían identificar qué hongos eran los más cotizados por su sabor si no también aquellos que eran perjudiciales o directamente mortales. También se conoce que permitían que los soldados se alimentasen de setas antes de las batallas para aumentar la moral y bajo el argumento que eran buenas para la constitución y fortaleza de las tropas.

En Asia, no existía tal miedo por el envenenamiento por hongos silvestres, principalmente porque estaban más vinculados con tratamientos medicinales y se consideraban una comida vigorizante. Los médicos recetaban estos hongos de acuerdo a los conocimientos tradicionales para las aflicciones de sus pacientes resultando indirectamente en un control cultural para evitar la intoxicación accidental. En la medicina tradicional china se aplicaban hasta 200 especies diferentes de hongos con diferentes propiedades para tratar y prevenir dolencias. Recientemente muchos autores están redescubriendo en estos hongos compuestos con actividades estimulantes del sistema inmune, antitumorales e inhibidores víricos entre otras funciones para los que ya se empleaban extractos de estas setas ([Rathore y col., 2017](#); [Money, 2016a](#); [Lee y col., 2012](#)). Algunos ejemplos son *Coriolus versicolor* (Cola de pavo), *Ganoderma lucidum* (Reishi) o *Lentinula edodes* (Shitake). De este último es destacable la facilidad de su cultivo, así como su presencia en gran cantidad de platos de la gastronomía asiática.

A pesar de su relativa importancia en todas estas antiguas civilizaciones su consumo se basaba en la recolección de setas silvestres y no hay evidencias claras de que estos hongos fuesen domesticados y cultivados a gran escala para mantener la demanda de la población. Una posible excepción es el método de remojo y golpeo desarrollado en Asia donde granjeros chinos y japoneses se percataron que poniendo troncos inoculados con el micelio del hongo deseado podía propagarse a troncos cercanos y si se ponían en remojo con agua fría y se les golpeaba con un mazo podía inducirse la producción de cuerpos fructíferos recolectables. El único inconveniente era que este método era muy ineficaz y poco fiable, aunque con el paso de los siglos sirvió de base para el cultivo tradicional sobre troncos que hoy en día aún se utiliza ([Stamets, 2000](#); [Money, 2016b](#)).

En occidente, durante la Edad Media gran parte del conocimiento sobre hongos comestibles y tóxicos pasó al olvido con el rechazo a los textos clásicos de la época griega y romana, conservándose escasos conocimientos sobre el uso de hongos. En la Europa occidental los hongos llegaron a relacionarse con prácticas prohibidas como la magia o la brujería. El crecimiento de círculos de setas producidos por la expansión del micelio se creía que se debía a los derrames de los calderos donde las brujas preparaban sus pócimas (Figura-I.1). En el folclore inglés y celta se relacionaban con la aparición de hadas y sirvieron de inspiración para autores como Shakespeare en "El sueño de una noche de verano". En cualquier caso, el miedo a ser maldito o castigado por perturbar estos lugares disuadiría a la población de consumirlas o incluso de evitar los lugares donde se formaban. A pesar de todo, en Europa central y del este se continuó recolectando setas y hongos, aunque popularmente se consideraba una comida de pobres y ganado.

No es hasta los siglos XV y XVI, con la llegada del Renacimiento, que se recobraría el interés por la micología. La introducción del cultivo de setas en Europa no se produjo hasta el siglo XVII, en la Francia de Luis XIV. Se cree que esta introducción del cultivo de hongos surge de la necesidad de abastecer al palacio de forma regular, debido a la gran demanda de las cocinas del Rey Sol donde las setas eran un plato muy solicitado. Para esta tarea se destinaron cuevas cercanas a París, donde observaron que las setas crecían con mayor facilidad. Desde Francia, esta práctica se extendió a los agricultores ingleses. A comienzos del siglo XIX esta tendencia llegó a los Países Bajos

y a finales del mismo siglo (años 1880s) la práctica cruzó el Atlántico asentándose en Estados Unidos donde a finales de siglo empezó a extenderse su producción comercial. A comienzos del siglo XX en las minas de Limburgo, en los Países Bajos, comenzó a explotarse el cultivo de hongos a escala industrial y a mediados de siglo se produjo la popularización del champiñón blanco en el mercado europeo.



Figura-I.1. "Círculo de las brujas". (Tomado de [Nabors y col., 2016](#)).

En España el cultivo de setas y hongos comestibles, fundamentalmente champiñones comienzan en los años 1930. Las principales zonas de producción de champiñón en España se localizan en La Rioja, Navarra, Aragón y en Castilla la Mancha donde aparece un núcleo de cooperativas que aglutina gran parte de la producción de hongos comestibles ([García-Mancha, 2013](#)).

Los orígenes de la implantación de esta industria se remontan a las actividades de subsistencia, adaptación e innovación llevada a cabo por familias de La Rioja durante el inicio de la década de 1930, aprovechando las cuevas naturales y la ganadería de la región. En los años 1950, los productores de vinos se reestructuraron en cooperativas, trasladándose a naves industriales y dejando vacantes las tradicionales bodegas en cuevas, covachuelas y calados donde hasta entonces desarrollaban su producción. Este espacio resultaba ideal para el crecimiento de los hongos por su aislamiento térmico y permitió que los primeros productores pudieran llevar a cabo su trabajo de manera satisfactoria y rentable. A medida que más gente intentaba entrar en el mercado de la producción del champiñón, los espacios disponibles fueron decreciendo. Las

cuevas naturales o las explotaciones mineras abandonadas fueron colonizadas por estos cultivadores de setas que hasta el momento se encontraban presionados a emigrar para encontrar trabajo y veían en esta actividad una alternativa viable para su subsistencia y desarrollo.

El sustrato de cultivo no suponía un problema debido a la abundancia de ganado equino, más de 25.000 cabezas según el censo de 1987, que suministraba la materia prima para el compostaje. Aun así, cada criador de champiñones elaboraba su propio compost y no fue hasta 1975 que empezaron a aparecer las primeras fábricas de compost especializadas en la fabricación de sacas que permitió al sector especializarse en el cultivo. Hasta el momento el estiércol se apilaba en las bodegas formando cordones, con la ayuda de maquinaria y se compostaba hasta su madurez momento en que eran inoculados y cubiertos con tierra. El nuevo modelo especializado en la producción de compost, importado de cooperativas de Cuenca y Francia permitió el crecimiento de la industria del champiñón crecer hasta convertirse en la segunda actividad agrícola más importante de La Rioja y Castilla-La Mancha, tras la vinicultura.

El arraigo de la industria del champiñón en España y particularmente en la Rioja y Castilla-La Mancha se debe a la aplicación de los principios de reaprovechamiento de espacios abandonados, desechos de otras actividades y a la iniciativa de gente joven emprendedora. 60 años tras el inicio de estos acontecimientos, estos principios de reciclaje están más vigentes que nunca. Las nuevas tecnologías en el reaprovechamiento de residuos, el aprovechamiento del actual tejido de producción y la elevada formación de las últimas generaciones pueden traer la próxima revolución a este sector que comenzó como una forma de subsistencia hasta crecer y colonizar gran parte de la región central de España.

1.2. LOS HONGOS: GENERALIDADES

Pese a que históricamente los hongos siempre se han tratado dentro de los apartados botánicos es un grupo mucho más complejo y variado (Cepero y col., 2012). Todos los hongos son organismos eucariotas heterótrofos quimiorganótrofos, que obtienen los nutrientes que necesitan mediante digestión extracelular al secretar enzimas al medio. Aunque este tipo de alimentación es frecuentemente saprofita para los llamados "hongos superiores" también existen especies parasitarias y depredadoras.

Los hongos son uno de los iconos de los organismos descomponedores que aceleran la degradación de materia orgánica en el medio. Esta catálisis favorece la formación de relaciones mutualistas entre plantas y hongos como en el caso de los líquenes o de las micorrizas y hongos endófitos.

Morfológicamente la etapa vegetativa del ciclo de vida de un hongo puede ser unicelular como en el caso de levaduras o pluricelular filamentosa en el caso de los mohos. Estos filamentos que a su vez pueden presentar cierta segmentación o tabicación y poseer varios núcleos que se denominan hifas y a la totalidad de las hifas, a todo lo que comprende el hongo, se denomina micelio (Figura-I.2).

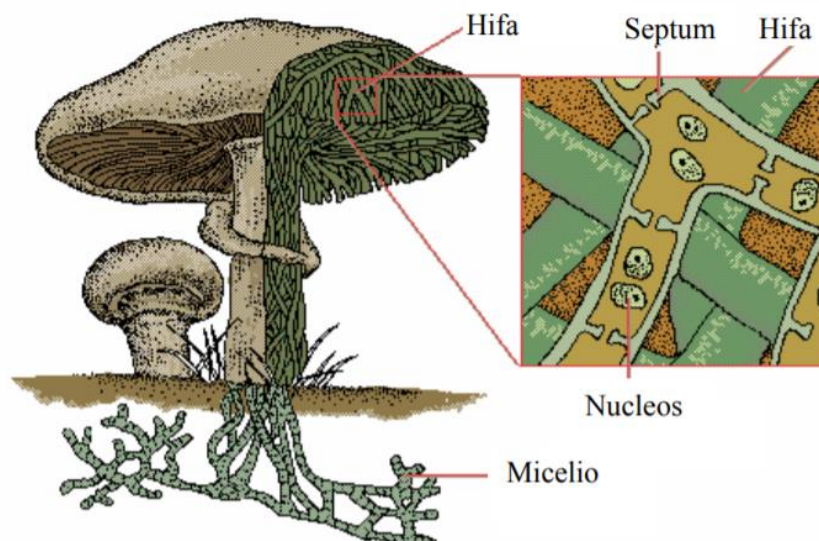


Figura-I.2. Esquema de la agrupación de las hifas fúngicas para formar el micelio que crece dentro de la tierra o del sustrato y del cuerpo fructífero de tamaño macroscópico. (Sanchez-Escudero, 2016)

Su estructura celular suele presentar una pared celular con quitina, un polisacárido de N-acetil-D-glucosamina, que actúa como una barrera que aporta rigidez y protege del medio además de asistir en la división celular. Esta pared es diferente de las células vegetales que presentan celulosa. Otra característica diferenciadora con las plantas es el uso del glucógeno como polisacárido de reserva característica que comparten con los animales.

La reproducción puede ser asexual, mediante la formación de esporas o escisión del micelio por ruptura o sexual, mediante la conjugación de hifas compatibles y la formación de estructuras de dispersión de esporas.

Taxonómicamente los hongos se han reestructurado desde su clasificación original tras la aplicación de técnicas de Biología Molecular (secuenciación de ácidos nucleicos). Aunque existen varias propuestas recientes, como la taxonomía sugerida por Hibbet y col., (2007) o la de Ruggiero y col (2015) (actualización de la propuesta por Blackwell y Spatafora, (2004)) su aplicación al grupo de hongos superiores, utilizados en este trabajo de tesis, se ha mantenido estable ante las sucesivas reestructuraciones taxonómicas (ver Figura- I.3).

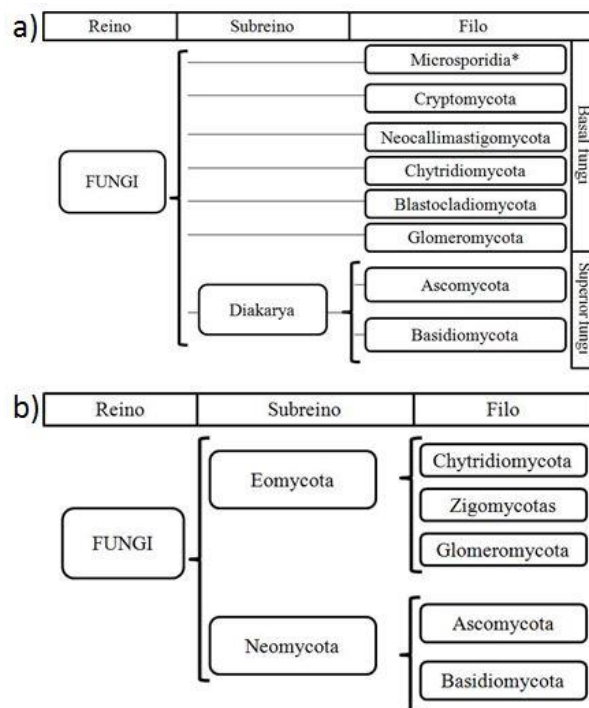


Figura-I.3. Taxonomía del reino Fungi: Propuestas de organización simplificada
a) según (Hibbet y col., 2007), b) según (Ruggiero y col., 2015).

De forma simplificada, Ruggiero y col. (2015) proponen la división del reino fungi en dos subreinos, Neomycota, englobando a filos Ascomycota y Basidiomycota y Eomycota conteniendo a los filos Chytridiomycota, Glomeromycota y Zygomycota.

Subreino Eomycota: Conocidos como los hongos basales es el principal foco de debate en la reestructuración taxonómica. Grupos como Microsporidia o Cryptomycota, parásitos intracelulares con reducida presencia mitocondrial, comparten características con hongos, como la presencia de pared celular con quitina en algún momento de sus ciclos vitales. Microsporidia se considera un grupo hermano de los hongos y la inclusión de Cryptomycota en el reino fungi es incierta. Entre sus características presentan morfologías simples o poco diferenciadas como células de vida libre o hifas cenocíticas.

Chytridiomycota: Han sido históricamente considerados el grupo más primitivo de hongos por la presencia de flagelo basal. La clasificación molecular de ADNr indica que es un grupo basal polifilético donde los órdenes que componen a este filo son de origen monofilético, motivo por el cual hay discrepancia entre propuestas recientes (Blackwell y col. 2004).

Zygomycotas: Definido por la presencia de una meioespora o zigospora y a la ausencia de flagelo. Este grupo es polifilético e incluye numerosos grupos monofileticos. Según el autor de referencia que se considere este filo puede llegar a desaparecer en la reorganización dando lugar a varios grupos monofileticos (Hibbet y col., 2007).

Glomeromycota: Este filo es el que se encuentra más próximo filogeneticamente a los llamados hongos superiores. Presenta micorrizas arbusculares que le permiten establecer interacciones con las plantas. Blackwell y spatafora estiman que el 80% de las especies de plantas interactúan con este grupo y poseen una fuerte importancia ecológica en los ecosistemas terrestres.

Subreino Neomycota o Diakaya: Son los denominados hongos superiores y contiene a los géneros más conocidos. Entre sus características fisiológicas destacan la compartimentación en sus hifas, células binucleadas o diploides y la formación de estructuras ordenadas para la dispersión de esporas durante la reproducción sexual.

La compartimentación de las hifas permite el intercambio controlado de nutrientes y disminuye la pérdida de citoplasma por roturas. Ante esta compartimentación el control del material genético para la división puede llevarse a cabo de forma más controlada que en hifas cenocíticas lo que a su vez permite la formación de las ascas o basidios, las principales señas de identidad, morfológica de los filos que caracterizan a los hongos superiores.

Ascomycota; la principal seña de identidad de esta división es la formación de ascas y ascosporas durante su reproducción sexual. Constituye la división más numerosa incluyendo desde levaduras (como *Sacharomyces*), hongos filamentosos (*Penicillium*), hasta hongos simbioses de raíces de plantas con cuerpos fructíferos como trufas (*Tuber*) u hongos con tallo como las colmenillas (*Morchella*).

Basidiomycota; Los basidiomicetos son los hongos que presentan una mayor complejidad estructural. Las hifas presentan una compartimentación completa con septos con doliporo y unas estructuras derivadas del retículo endoplasmático denominadas parentosomas. Durante la reproducción sexual las estructuras de maduración de esporas se denomina basidios y las especies que realizan reproducción asexual mediante esporas forman conidios. El ciclo de vida comienza con esporas haploides que al germinar forman micelios que buscan entrar en contacto con hifas compatibles. cuando dos de estas hifas haploides entran en contacto y son compatibles, se genera un proceso de plasmogamia del que se desarrolla el micelio dicaríotico vegetativo. Llegado el momento el micelio dicaríotico desarrollara cuerpos fructíferos para la maduración de los basidios. Los dos núcleos del micelio dicaríotico se fusionan para crear núcleos diploides e inmediatamente entran en un proceso de recombinación meiótica para generar 4 núcleos haploides que serán la base para la nueva generación de basidioesporas. (Figura-I.4)

Las especies más comunes de hongos comestibles se encuentran en el subfilo Agaricomycotina, las cuales presentan formación de esporas mediante reproducción sexual en la que se valen de una estructura multicelular llamada basidiocarpo o cuerpo fructífero. Los ascomicetos que también forman cuerpo fructífero reciben el nombre de ascocarpo. Comúnmente se le denomina esporocarpo a un cuerpo fructífero cuando no se está teniendo en consideración el tipo de espora/filo.

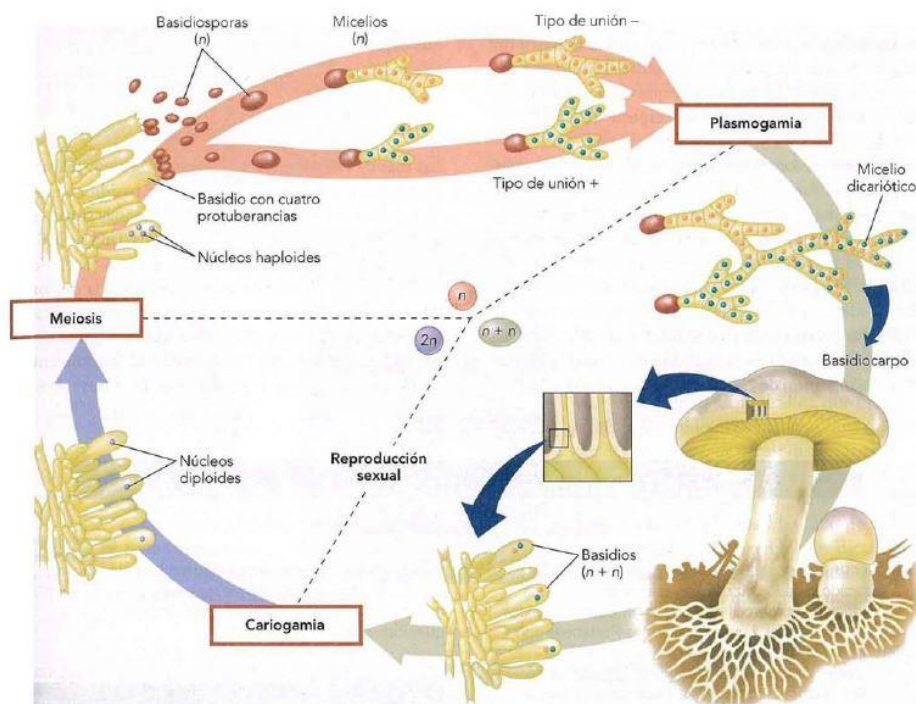


Figura- I.4. Ciclo reproductivo de los hongos basidiomicetos (Tomado de Nabors y col., 2016).

Las estructuras presentes en el cuerpo fructífero y la morfología de las mismas son una de las herramientas básicas para la identificación de especies y siguen empleándose en la recolección de hongos silvestres (Figura-I.5). La primera división apreciable de un cuerpo fructífero es la presencia de un sombrero y un tallo o pié, quedando bajo tierra el principal cuerpo vegetativo del hongo el micelio. La parte superior y más expuesta del sombrero se encuentra recubierta por una cutícula protectora mientras que el principal cuerpo del sombrero está compuesto por la aglomeración de hifas. En la parte inferior se encuentran las estructuras en las que maduran las esporas, las laminas y laminillas (cuyo conjunto recibe el nombre de himenio) donde se diferencian las basidioesporas. En algunas excepciones el himenio puede presentarse como una estructura porosa como en el caso de las boletales. El pié, al igual que el principal cuerpo del sombrero está compuesto por la aglomeración de hifas y su principal propósito es la separación del sombrero del sustrato donde está creciendo para maximizar la dispersión aérea (anemocoria). Algunas estructuras asociadas al pié son el anillo o velo y la volva, ambas estructuras pueden aparecer como restos de cubiertas protectoras durante la maduración del esporocarpo.

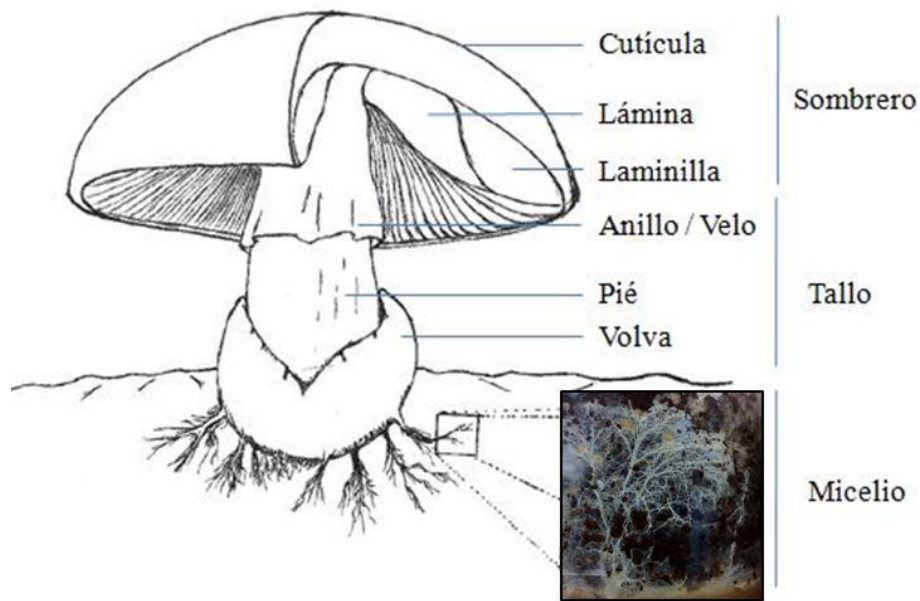


Figura-I.5. Principales partes del cuerpo fructífero de un basidiomiceto común en estado avanzado de su madurez.

Durante la maduración del cuerpo fructífero el micelio que protege a los tejidos productores de esporas se mantiene cerrado abriéndose solo cuando las esporas están listas para ser liberadas al medio (Figura-I.6). El crecimiento del tallo también es otro factor que colabora a la optimización puesto que es observable que en ambientes poco ventilados aparecen tallos mas alargados y es un metodo visual aplicable para indicar que un cultivo necesita más aireación.

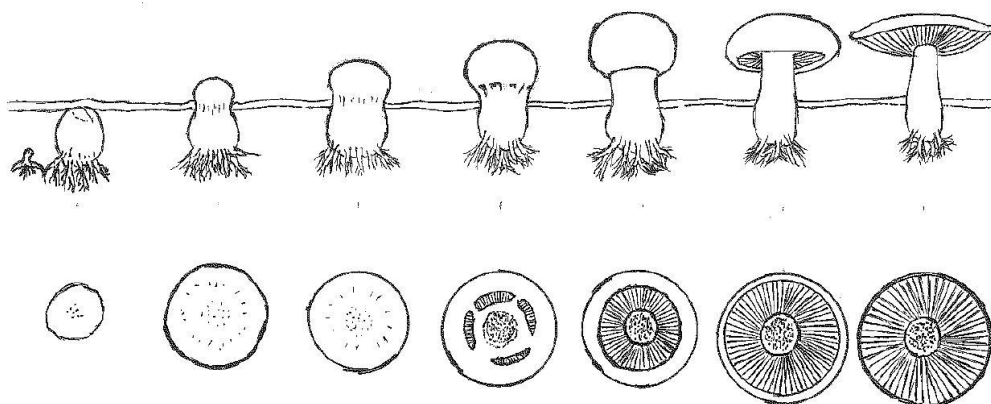


Figura-I.6. Diferentes estados del desarrollo y formación de un cuerpo fructífero de un basidiomicete (*Agaricus bisporus*). (Adaptado de [Hammond y Nichols, 1975](#)).

1.3. LOS HONGOS COMESTIBLES; INTERÉS ECONÓMICO Y NUTRICIONAL.

1.3.1. Hongos comestibles silvestres y cultivables

Al hablar de hongos comestibles generalmente se hace referencia a los carpóforos de macromicetos (popularmente conocidos como "setas") y suelen excluirse organismos como levaduras u hongos filamentosos que participan en la maduración de alimentos como quesos. Dentro de este grupo se incluyen los “hongos silvestres comestibles” y los “hongos comestibles cultivables silvestres” o simplemente “hongos cultivables comestibles”. Los hongos silvestres comestibles se consideran aquellas especies cuyo consumo está ligado a la recolección en bosques o zonas rurales debido a su vinculación con especies vegetales que dificulten o imposibiliten su "domesticación". Según este criterio hongos como los *boletus* serían hongos silvestres comestibles mientras que un champiñón sería un hongo comestible cultivable silvestre.

La FAO (*Food and Agriculture Organization*; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) cataloga los géneros de hongos comestibles según el uso. Catalogando de "alimento" las especies para las que se ha confirmado el consumo, "comestible" para aquellas especies en las que se ha observado consumo sin confirmación oficial y "medicinal" para aquellas especies con alguna propiedad beneficiosa para la salud científicamente demostrada (Boa, 2005).

El número de especies aptas para consumo de géneros como: *Agaricus*, *Amanita*, *Boletus*, *Pleurotus* o *Lentinula*, según la FAO, son 60, 83, 72, 40 y 3, respectivamente. El género *Agaricus* presenta al menos 43 especies caracterizadas como alimento y 17 como comestible. Además 6 de ellas son consideradas de uso medicinal, como *A. blazei*, originario de Brasil y muy utilizado en China y Japón. Las especies cultivables más populares en Europa y América para alimentación corresponden a los géneros, *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula* (Figura - I.7).

Dentro del género *Agaricus*, *A. bisporus* o champiñón blanco es el que se cultiva en mayor cantidad, con más de 950.000 de toneladas producidas en 2017 (FAOSTAT). En segundo lugar, le sigue el género *Pleurotus* siendo la especie más destacada *P. ostreatus*. La tercera especie cultivable más popular es *Lentinula edodes* también conocida como shiitake, una seta muy empleada en la cocina oriental y con una

producción mucho más significativa en el mercado asiático que en el occidental. En la Figura-I.7 se muestran el aspecto morfológico de los carpóforos de estas tres especies.



Figura-I.7. Principales hongos comestibles: a) *Agaricus bisporus*, b) *Pleurotus ostreatus* y c) *Lentinula edodes*

Otros géneros como *Boletus* o *Lactarius* que se recolectan de forma silvestre durante la temporada suelen comercializarse en los mercados locales, aunque es poco frecuente su explotación a gran escala.

1.3.2. Interés económico del cultivo de hongos comestibles

En cuanto al interés económico, la recolección temporal de setas, llevada a cabo por recolectores locales y aficionados a la micología, a pesar de su amplia aceptación popular y de suponer una fuente de ingresos para determinadas familias, generalmente con pocos recursos y de un suplemento a la dieta en algunos países en desarrollo, representa un mercado muy limitado frente al mercado de los hongos y setas comestibles cultivables; siendo las especies cultivables las que realmente generan un mercado de abastecimiento a nivel global y de gran relevancia económica.

La demanda de hongos comestibles ha experimentado un incremento significativo en estas últimas décadas incrementándose la media de consumo de 1 kg por persona en el año 1997 hasta más de 4 kg por persona en el año 2014, y con una tendencia en aumento (Royse, 2014). Este incremento no implica que la demanda de todos los hongos comestibles crezca por igual ya que el mercado es muy heterogéneo. Al menos en España, el mercado está dominado por unas pocas especies clave: *Agaricus* sp, *Pleurotus*, sp, hongos silvestres y hongos exóticos, siendo la producción de 159.018 Tm en el año 2017.

A. bisporus y sus variedades (champiñón blanco y Portobello o champiñón marrón) dominan la demanda del consumo total de setas, con un 70% (111.312,6 Tm). Los hongos del genero *Pleurotus*, principalmente *P. Ostreatus*, *P. pulmonaris* y *P. eryngii*, ocupan el siguiente puesto en la demanda española, con un 15% (23.852,7 Tm), seguidas de una colección de hongos silvestres o de temporada con el 10% (15.901,8) y setas exóticas (7.950,9 Tm) correspondiente al 5% del total (Figura-I.8).

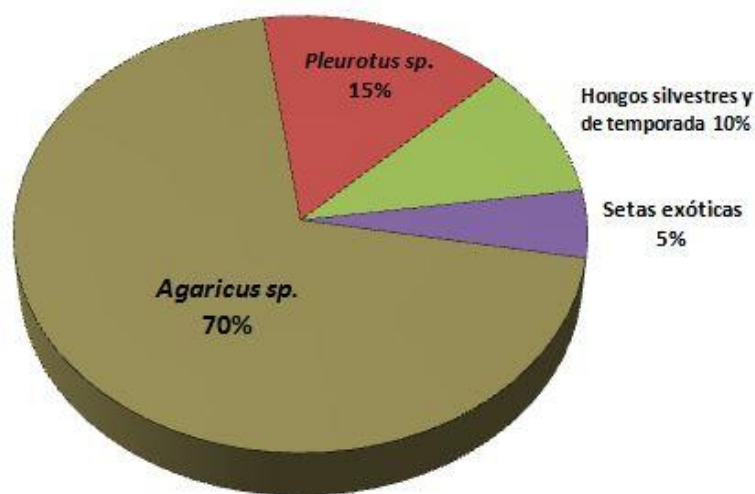


Figura-1.8. Distribución del consumo de hongos comestibles por especies o grupos de hongos comestibles en España.

En los dos últimos grupos se incluyen las setas de pie azul o lepidistas (*Lepista nuda*), los perretxikos o setas de primavera (*Calocybe gambosa*), los boletos (*boletus edulis*), las colmenillas (*Morchella esculenta*), los níscalos (*Lactarius deliciosus*) y cantarelas o rebozuelos (*Chantarellus cibarius*). El 5% restante se compone de setas exóticas como el shitake (*Lentinus o Lentinula edodes*), la colibia de pie aterciopelado o enokitake (*Flammulina velutipes*), la seta de paja (*Volvariella volvacea*), y las llamadas setas "oreja" por su particular aspecto (*Auricularia auricula* y *A. polytrica*).

En cuanto al mercado del champiñón (111.312,6 Tm), el 66% (73.466,3 Tm) de la demanda se comercializa en forma de producto fresco, el 31 % (34.506,9 Tm) en forma transformada o en conservas y un 3% (3.339,4 Tm) como producto congelado (Larumbe, 2007; FAOSTAT, 2017) (ver Figura-I.9).

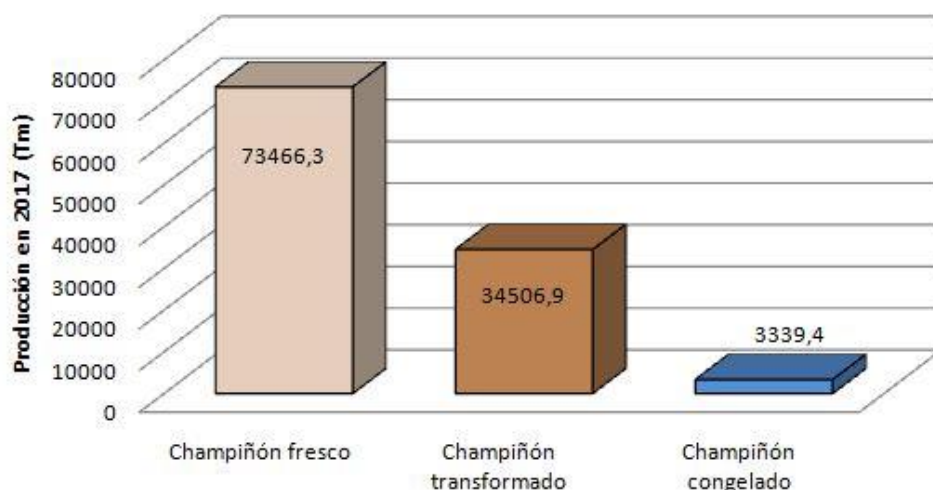


Figura-I.9. Distribución del consumo de champiñón en España: fresco, transformado y congelado (FAOSTAT, 2017).

1.3.2.1. Producción a escala mundial

El mercado de hongos comestibles ha experimentado un incremento en el volumen de mercado durante la última década del siglo XX y el comienzo del siglo XXI, pasando de aproximadamente 250.000 Tm anuales, a comienzo de los 90, a más de 10.000.000 de Tm en 2017 (FAOSTAT, 2017).

Gran parte de esta evolución se debe al incremento de producción llevado a cabo por China, que desbancó a la Unión Europea como principal productor en 2003. Hasta esa fecha, Francia, que desarrolló las técnicas modernas del cultivo, hasta los años 60 ostentaba el título de principal productor europeo, aunque Holanda, que desarrolló un método propio de cultivo y España, que importó ese modelo con pequeñas modificaciones pronto la superaron entre los años 60 y 90.

1.3.2.2 Distribución por países

En cuanto a la producción actual, el mayor productor de setas y hongos comestibles es China, abasteciendo un 78,33% de la producción mundial, le siguen, pero a una gran distancia, los Estados Unidos con un 4,20%, Polonia con el 3,02%, Países bajos con el 2,99%, y España con el 1,59% (FAOSTAT, 2017) (ver Tabla-I.1 y Figura-I.10).

Tabla-I.1. Principales países productores de hongos y setas comestibles (FAOSTAT, 2017).

Ranking	Área	Cantidad (Tm)	%
1°	China, Continental	7.855.698	78,33%
2°	Estados Unidos de América	421.208	4,20%
3°	Polonia	302.916	3,02%
4°	Países Bajos	300.000	2,99%
5°	España	159.018	1,59%
6°	Canadá	132.556	1,32%
7°	Reino Unido	99.652	0,99%
8°	Francia	99.096	0,99%
9°	India	98.246	0,98%
10°	Irán	76.893	0,77%
11°	Alemania	73.454	0,73%
12°	Italia	69.558	0,69%
13-20°	Otros	341.253	3,40%
	Total	10.029.548	

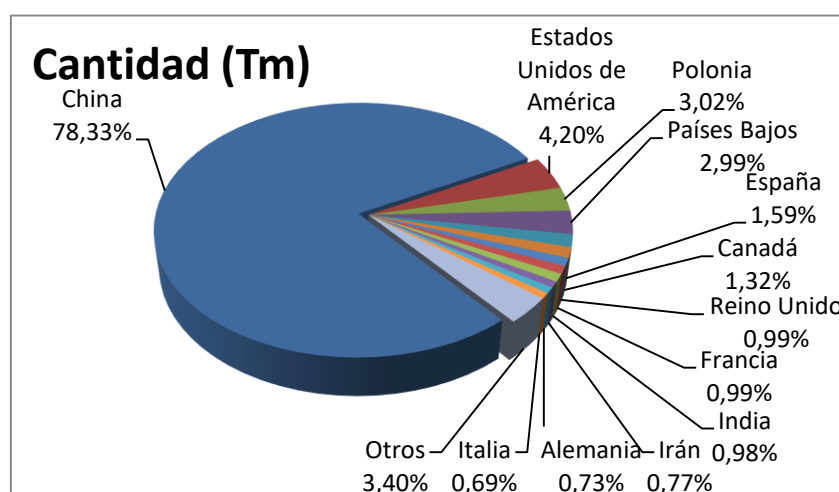


Figura-I.10. Distribución mundial de la producción de setas y hongos comestibles según los países productores (FAOSTAT, 2017).

Tradicionalmente, el mercado de las setas y hongos comestibles ha estado dominado por el cultivo de champiñón y sus variantes (30%), seguido de *Pleurotus* (25%) y Shiitake o *Lentinula* (10%). Recientemente se ha apreciado un cambio en esta tendencia. Según Los géneros más cultivados en la actualidad a nivel mundial son *Lentinula* (22%), *Pleurotus* (19%), *Auricularia* (17%), *Agaricus* (15%) y *Flamullina* (11%). Esta nueva tendencia vendría fuertemente influenciada por el mercado chino, y su dedicación a estos géneros mientras que Europa y América sigue fuertemente dominada por la producción de *Agaricus*. (Royse y col., 2017; Rühl y Kües, 2007).

1.3.2.3. Localización de la producción en España

Dentro de España la producción de setas y hongos comestibles se concentra en dos zonas bien diferenciadas: La zona de la Rioja que engloba parte de Navarra y Aragón y dentro de Castilla la Mancha en la región de La Manchuela junto a Cuenca y Albacete (Figura-I.11) (Larumbe, 2007).

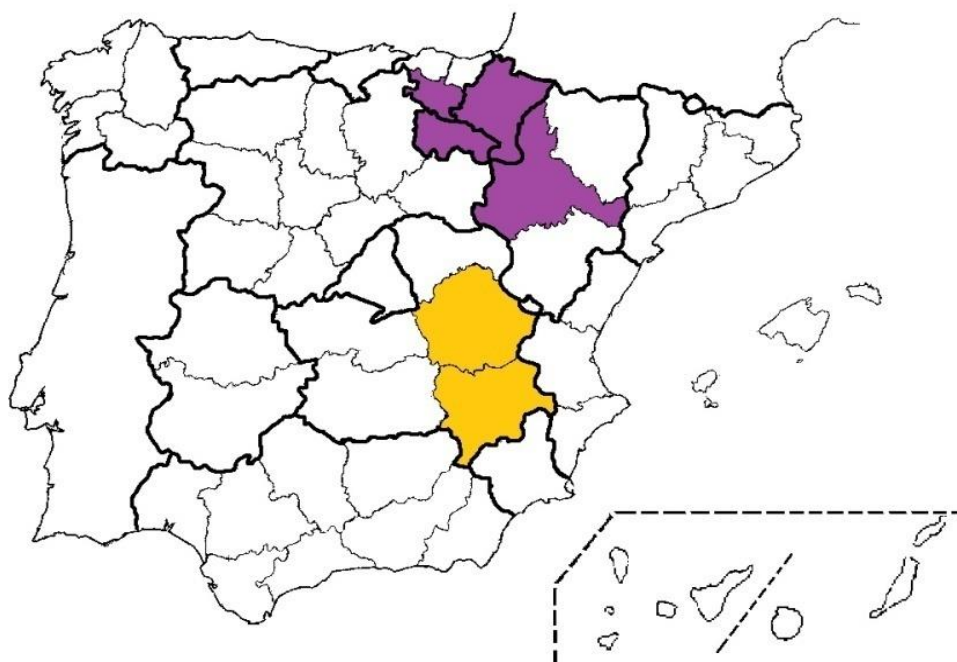


Figura-I.11. Principales zonas de producción y cultivo de hongos y setas comestible en España. (En morado La Rioja, en amarillo, la Manchuela).

La zona de La Rioja, donde se instauró inicialmente el cultivo de Champiñón en España, posee menos superficie destinada al cultivo, aunque con mayores rendimientos. La producción en La Rioja ronda el 60%, mientras que en La Manchuela se produce del orden del 35%, estando el restante 5% distribuido por el resto del país (Información suministrada por el **Grupo Riberebro**).

1.3.3. Interés nutricional

Los hongos comestibles, son apreciados, además de por su “*flavor*” (conjunto de sabores, olores, texturas, e impacto visual), también por poseer unas propiedades nutricionales de gran interés, consecuencia de su composición (Cheung, 2010). La composición nutricional de los hongos no es fija, y puede variar debido a diferentes factores, tanto bióticos (diferencias entre variedades, etapas de desarrollo del hongo, madurez de la cosecha, frescura de la muestra) como abióticos (composición del sustrato y técnicas y condiciones de cultivo), respectivamente (Barros y col., 2008c).

Estos alimentos se caracterizan por su elevado contenido en agua, cuyos valores oscilan entre el 82,7% de *Boletus edulis* y el 94,9% de *Cantharellus cibarius* (ver Tabla-I.2). En el caso de *A. bisporus* el contenido en agua suele oscilar entre el 91,1% y el 94,5%. Estos datos ponen claramente de manifiesto que el aporte energético de estos alimentos, en forma de alimento fresco, es bajo, similar al de algunos vegetales como la zanahoria o el brécol (unas 34 kcal/100 g, p.h.), unas 37,1 kcal/100g, p.h., en el caso del champiñón blanco (*Agaricus bisporus*) o 42,3 calorías/100g, p.h., en el caso de shiitake (*Lentinula edodes*).

Tabla-I.2. Contenido en humedad, peso seco y energía de los principales hongos comestibles, cultivables y silvestres. (Datos tomados de: Mattila y col., 2002b; Manzi y col., 2004; Barros y col., 2007a; 2008a y c; Kalac, 2009).

Hongo	Humedad (%)	Peso seco (%)	Energía (kcal/100 g p.h.)
<i>Lactarius deliciosus</i>	90,1±3,4	9,9±3,4	39,4±1,7
<i>Cantharellus cibarius</i>	92,4±2,5	7,6±2,5	37,6±1,3
<i>Boletus edulis</i>	88,0±5,3	12,0±5,3	40,0±1,6
<i>Lentinus edodes</i>	90,1±4,7	9,9±4,7	42,3±2,1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	91,4±4,3	8,6±4,3	36,8±1,6
<i>Agaricus bisporus</i>	92,8±1,7	7,2±3,7	37,1±2,2

Pese al reducido aporte calórico, los hongos comestibles son considerados una fuente interesante de proteínas debido a su contenido en aminoácidos esenciales y al abanico de vitaminas, compuestos biactivos y minerales que contienen, como más

adelante discutiremos. Por ello, actualmente, están siendo considerados como posibles sustitutos cárnicos en dietas hipocalóricas y para veganos ([Stephan y col., 2018](#)).

Centrándonos en el análisis de la materia seca, reportado en la bibliografía, en general y salvo algunas excepciones, los hongos tienen altas concentraciones de hidratos de carbono y proteínas y bajo contenido en grasa. Así, para los hidratos de carbono los mayores valores se han reportado para *Lentinula edodes* y *Flammulina velutipes* (87,1 g/100 g p.s.) y los más bajos para *Lepista nuda* (41,4 g/100 g p.s.), mientras que para las proteínas los mayores valores se han encontrado en *Lepista nuda* (44,2 g/100 g p.s.) y el más bajo en *Flammulina velutipes* (3,9 g/100 g p.s.). El contenido en grasa varía desde el 0,11 g/100 g p.s. de *Agaricus campestris* a los 9 g/100 g p.s. de *Lepista nuda*. El contenido en cenizas varía entre el 4,6 g/100 g p.s. de *Amanita rubescens* y los 32 g/100 g p.s., encontrados en *Lycoperdon perlatum* (ver Tabla-I.3).

En general, y de acuerdo con los datos publicados hasta 2010, los hongos silvestres muestran menor contenido en grasa que los cultivados y mayor cantidad de proteínas, exceptuando *A. bisporus* ([Barros y col., 2008a](#)), sin embargo, teniendo en cuenta datos más recientes ([Jedidi y col., 2016](#)), esta afirmación no es tan clara, (ver Tabla-I.3).

Por otro lado, y como ya hemos mencionado anteriormente, como consecuencia de su composición nutricional, los hongos son alimentos hipocalóricos, cuyos valores energéticos varían desde las 36,8 kcal/100 g p.h. de *Pleurotus ostreatus* y las 42,3 kcal/100 g p.h. de *Lentinus edodes* (Tabla-I.2) y sus valores son similares, independientemente de si son cultivados o silvestres ([Mattila y col., 2002b](#); [Barros y col., 2007a, 2008a](#)).

Seguidamente analizaremos con algo más de detalle los componentes nutricionales, centrándonos en los principales hongos comestibles, tanto cultivados: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, como silvestres: *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* y *Cantharellus cibarius*.

Tabla-I.3. Composición química, en peso seco, de las principales especies de hongos comestibles cultivables y silvestres.

Nombre científico	Nombre común	Hidratos de carbono % P.S.	Proteína % P.S.	Grasas % P.S.	Ceniza % P.S.	Fuente
<i>Agaricus bisporus</i>	Champiñón blanco	74,0	14,1	2,2	9,7	Reis y col., 2012
		65,4	22,5	3,5	8,5	Tsai y col., 2007
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>brunnescens</i>	Portobello	71,5	15,4	1,7	11,4	Reis y col., 2012
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleuroto ostra	85,9	7,02	1,4	5,7	Reis y col., 2012
		70,9	16,7	5,4	6,7	Jaworska y col., 2011
<i>Pleurotus eryngii</i>	Seta de cardo	81,4	11	1,5	6,2	Reis y col., 2012
<i>Lentinula edodes</i>	Shitake	87,1	4,4	1,7	6,7	Reis y col., 2012
		81,9	12,8	1,0	4,3	Carneiro y col., 2013
<i>Flammulina velutipes</i>	Enoki	87,1	3,9	1,7	7,3	Reis y col., 2012
<i>Agaricus campestris</i>	Bola de nieve	58,2	18,6	0,1	23,2	Kalac, 2013
<i>Amanita rubescens</i>	Amanita de vino	62,2	26	7,2	4,6	Kalac, 2009
<i>Boletus edulis</i>	Boleto	70,9	21,1	2,4	5,5	Kalac, 2013
		57,6	23,9	3,9	14,5	Jedidi y col., 2016
<i>Cantharellus cibarius</i>	Rebozuelo	56,32	35,79	1,47	6,42	Kalac, 2013
		72,2	12,3	2,8	12,6	Jedidi y col., 2016
<i>Lactarius deliciosus</i>	Níscalo	64,63	20,20	8,02	7,15	Kalac, 2013
<i>Lepista nuda</i>	Pie azul	41,4	44,2	9	5,4	Kalac, 2009
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Pedo de lobo	50,4	17,2	0,4	32	Kalac, 2009
<i>Macrolepiota procera</i>	Parasol	68,4	23,9	2,3	5,4	Kalac, 2009
<i>Ramaria botryris</i>	Coliflor rosa /seta de corral	50,8	39	1,4	8,8	Kalac, 2009
<i>Suillus granulatus</i>	Boleto granulado	74,3	16,5	4	5,2	Kalac, 2009
<i>Tricholoma portentosum</i>	Capuchina	64,7	19,6	5,8	9,9	Kalac, 2009
<i>Tricholoma terreum</i>	Negrilla	61,2	20,1	6,6	12,1	Kalac, 2009

1.3.3.1. Hidratos de carbono

La fracción mayoritaria del peso seco de los hongos comestibles es la correspondiente a los hidratos de carbono. Como se puede apreciar en la Tabla-I.3 el porcentaje correspondiente varía entre las especies, desde el 41,4% de *Lepista nuda* (Kalac, 2009), hasta el 87,1% de *Lentinula edodes* (Reis y col., 2012). Para las especies comestibles más comunes (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*) los valores suelen ser superiores al 65% mientras que las especies silvestres documentadas suelen presentar valores algo inferiores en un rango entre el 40 y el 70%, siendo los más frecuentes los valores próximos al 60%. Esta diferencia en el contenido de hidratos de carbono podría deberse a la diferente composición de los medios de crecimiento entre especies cultivables y silvestres, donde las especies cultivables crecen sobre medios optimizados, mientras que las especies silvestres lo hace sobre medios naturales, formados al azar. Aunque la información sobre medios cultivos empleados industrialmente es escasa, una práctica común, a escala industrial, es la suplementación del compost o medio de cultivo de manera que la relación C/N sea del orden de 12 (García-Rollán, 2007), para estimular la producción de biomasa, mientras que los hongos silvestres se encuentran en un ambiente mucho más limitado nutricionalmente.

Los Hidratos de carbono presentes en los hongos comestibles se encuentran en forma de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, siendo los polisacáridos la fracción más abundante pudiendo considerarse como un homólogo funcional de la fibra dietética vegetal (Muszynska y col., 2017), por lo que potencialmente podrían utilizarse como prebióticos (Hess y col., 2018). Entre los polisacáridos de acuerdo con su abundancia destacan los glucanos: α -D-Glucanos (polímeros ramificados de glucosa con uniones α -1,4 y α -1,6) y/o β -D-glucanos (polímeros ramificados de glucosa con uniones β -1,3 y β -1,6), la quitina (polímero lineal de N-acetil-glucosamina) y los mananos (polímeros de manosa).

Si bien, la mayor parte de los hidratos de carbono de los hongos comestibles están en forma de polisacáridos (glucanos, quitina y glucógeno), los hongos comestibles también contienen otros azúcares simples como el polialcohol manitol, el cual puede llegar a representar hasta el 30% del peso seco correspondiente a hidratos de carbono en *Agaricus bisporus* (Muszynska y col., 2017) y el disacárido de glucosa trehalosa

(Tabla-I.4), habiéndose también descrito la presencia de melezitosa (trisacárido no reductor) en algunas especies ([Barros y col., 2008a](#)).

Tabla-I.4. Polialcoholes, disacáridos y trisacáridos frecuentemente encontrados en los hongos comestibles (Datos tomados de: [Barros y col., 2007a](#); [Barros y col., 2008b](#); [Carneiro y col., 2013](#)).

Hongo	Manitol (g/100 g, p.h.)	Trehalosa (g/100 g, p.h.)	Melezitosa (g/100 g, p.h.)
<i>Lactarius deliciosus</i>	1,36	0,27	-
<i>Cantharellus cibarius</i>	0,83	0,61	-
<i>Boletus edulis</i>	0,35	0,97	0,03
<i>Lentinus edodes</i>	2,33	1,32	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2,30	0,84	-
<i>Agaricus bisporus</i>	1,96	0,08	0,05

1.3.3.2. Proteínas

La segunda fracción mayoritaria en los hongos comestibles, después de los carbohidratos, lo constituyen los compuestos proteicos: aminoácidos, péptidos y proteínas. El contenido en proteínas, como porcentaje en base al peso seco, varía según la especie, desde el 3,9 % en *Flammulina velutipes* (Enoki) al 56,3% en *Agaricus arvensis* (Bola de nieve) ([Reis y col., 2012](#); [Kalac 2013](#)).

Esta fracción rica en compuestos nitrogenados no está compuesta exclusivamente de proteínas, ya que además contiene cantidades importantes de quitina (polímero de N-acetil glucosamina), aminoácidos libres y ácidos nucleicos y nucleótidos entre otros compuestos. Gran parte del valor nutricional recogido en los estudios recientes se realiza en base al contenido de aminoácidos libres o péptidos pequeños debido a su elevada biodisponibilidad por lo que la información respecto a la distribución proteica es más limitada. En *P. ostreatus* se ha podido observar que tanto el contenido como la digestibilidad de las proteínas disminuye durante el crecimiento y maduración del cuerpo fructífero y que están principalmente constituidas por albuminas,

globulinas, glutelinas y prolaminas con unos porcentajes de 24,8%, 11,5%, 11,5% y 5,7% respectivamente ([Bauer-Petrovska y col, 2001](#)).

El contenido en proteínas en los hongos comestibles se determina, habitualmente, mediante el método Kjeldahl que mide el contenido en nitrógeno total. Valor que se emplea para obtener la concentración a proteica mediante multiplicación por el correspondiente factor de conversión. El factor de conversión actualmente empleado para la conversión del nitrógeno total en proteínas en los hongos comestibles oscila sobre 4,38 ([Braaksma y Schaap, 1996](#)). Este factor kjeldhal se revisó durante la década de los 90 en los que numerosos estudios determinaban que entre un 60 y un 77% del Nitrógeno total presente en los hongos correspondía a nitrógeno proteico ([Fujihara y col., 1995, 2001](#); [Braaksma y Schaap, 1996](#); [Mattila y col., 2002b](#)). Los valores de nitrógeno no proteico en *A. bisporus* oscilaban entre 0,43 y 0,79 g/100g de p.h., en *P. ostreatus* y *L. edodes* se obtenían rangos de 0,25- 0,34 y 0,49-0,52 g/100g de p.h. respectivamente ([Kurzman y col., 1997](#); [Mattila y col., 2002b](#)). Es decir, la proporción de nitrógeno no proteico en los principales hongos comestible, asumiendo una humedad media del 90%, está en el rango de 3 a 6,1 g/100 g p.s., ([Bauer-Petrovska, 2001](#)). En la Tabla-I.5 se muestran los valores de proteínas encontrados en los principales hongos comestibles, que como podemos observar presenta un amplio rango en el contenido, incluso para la misma especie.

Tabla-I.5. Contenido en proteína según diferentes autores.

<i>Hongo</i>	Proteína (g/100g p.s.)	Fuente
<i>A. Bisporus</i>	14,08	<i>Kalac 2013</i>
	22,5	<i>Tsai y col. 2007</i>
<i>P. Ostreatus</i>	7,02	<i>Kalac 2013</i>
	16,69	<i>Jaworska y col. 2011</i>
<i>L. edodes</i>	4,4	<i>Kalac 2013</i>
	12,76	<i>Carneiro y col. 2013</i>
<i>B. edulis</i>	21,07	<i>Kalac 2013</i>
	23,91	<i>Jedidi y col. 2016</i>
<i>C. cibarius</i>	12,37	<i>Jedidi y col. 2016</i>
<i>L. deliciosus</i>	29,74	<i>Kalac 2009</i>

La fracción proteica no sólo es interesante desde un punto de vista cuantitativo, si no también por su potencial nutritivo. Los hongos comestibles contienen aminoácidos

esenciales importantes en la dieta y suponen un factor importante en el sabor. La presencia de ciertos aminoácidos se ha relacionado con determinados sabores; así el aspártico y glutámico con el umami, la alanina, glicina, serina y treonina con el dulce y la arginina, histidina, isoleucina, metionina fenilalanina, triptofano tirosina y valina con el amargor ([Manninen y col., 2018](#)).

Los hongos contienen prácticamente todos los aminoácidos esenciales para el ser humano: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina ([Berg y col., 2007](#)), aunque las proporciones encontradas difieren significativamente entre especies, como se muestra en la Tabla-I.6.

Tabla-I.6. Aminoácidos esenciales encontrados en las proteínas de hongos comestibles en comparación con determinadas verduras (mg/g de p.s. Tomado de [Mattila y col. 2002b](#) y adaptado de [USDA 2004](#)).

	<i>A. bisporus</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. edodes</i>	Patata	Zanahoria	Coliflor	Proteína huevo
Thr	14,42	13,25	11,67	3,42	2,22	10,59	5,8
Ile	11,82	10,25	9,40	3,71	2,48	11,10	7,4
Leu	19,87	17,38	15,83	5,30	3,25	16,39	10,8
Lys	18,57	15,75	14,52	5,78	2,99	15,13	7,4
Met	4,29	4,38	3,45	1,40	0,77	3,91	4,7
Val	15,71	14,00	14,76	5,78	3,67	17,65	9,8
Phe	13,90	13,88	10,83	4,05	2,22	10,59	7,6
Trp	7,86	3,88	1,07	1,01	1,02	2,52	0,71
Tyr	36,75	27,38	31,55	1,93	1,20	6,56	4,6
His	22,69	6,46	5,45	1,68	3,42	7,06	2,8
Cys	2,99	3,50	2,86	0,82	0,09	1,89	2,9

En los hongos y setas comestibles no todos los aminoácidos están formando proteínas si no que una importante cantidad están en forma de aminoácidos libre, así *P. ostreatus* posee la mayor concentración con 77,62 mg/g p.s., seguido de *A. bisporus* con 70,03 mg/g, p.s., *L. edodes* con 41,4 mg/g, p.s., *B. edulis* con 29,54 mg/g. p.s. y *C. cibarius* con 21,99 mg/g, p.s., ([Poojary y col. 2017a,b](#), [Manninen y col. 2018](#)). La composición de aminoácidos libres de los hongos comestibles también varía con la especie.

Pese al bajo contenido de calorías, el aporte proteico es equivalente al de algunas legumbres, y su composición es rica en aminoácidos esenciales aportando

significativamente más tirosina, fenilalanina, threonina, cisteína y lisina que vegetales como la zanahoria, la coliflor o la patata ([Mattila y col., 2002b](#)). Es importante recordar que la Lisina no puede ser sintetizada por los animales siendo a menudo un factor limitante en la formulación de dietas para el ganado.

Los hongos comestibles, además de contener casi todos los aminoácidos esenciales, contienen además otros aminoácidos no proteogénicos, como la ergotioneína (derivado de la histidina), con propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud ([Kalaras y col., 2017](#)).

1.3.3.3. Lípidos

Aunque los hongos y setas comestibles son productos con un bajo contenido en grasa, esta está constituida por ácidos grasos libres, mono-, di- y triglicéridos, esteroides y ésteres de esteroides, tocoferoles y fosfolípidos, y es significativamente más reducida que las otras dos grandes fracciones (carbohidratos y proteínas). Entre los valores registrados en la bibliografía estos varían entre el 0,1% p.s. de *A. campestris* hasta el 9% de *Lepista nuda* ([Kalac 2009, 2013](#))

Tal como se puede apreciar en la Figura I.12 los ácidos grasos mayoritariamente encontrados en los hongos y setas comestibles son los ácidos grasos insaturados: ácido linoleico (C18:2 n6) y ácido oleico (C18:1 n9) seguidamente del ácido graso saturado: ácido palmítico (C16:0) ([Barros y col., 2008a](#)). Si bien, en los hongos y setas comestibles se pueden detectar hasta 12 ácidos grasos más en menor medida. ([Barros y col., 2007a](#)).

En relación con el *flavor* de los hongos y setas comestible, cabe destacar que el ácido linoleico (C18:2 n6), es el precursor del 1-octen-3-ol o alcohol de los hongos, y es el principal compuesto responsable del aroma de muchos hongos y uno de los principales responsable de su sabor característico. Además, este compuesto es atrayente de determinados insectos ([Kline y Lemire, 1996](#)).

El ácido 10-oxo-trans-8-decanoico (ODA) aunque se sintetice en una baja cantidad, resulta esencial para el desarrollo del micelio puesto que ejerce una acción hormonal que induce el crecimiento de las hifas (Tressl y col., 1982).

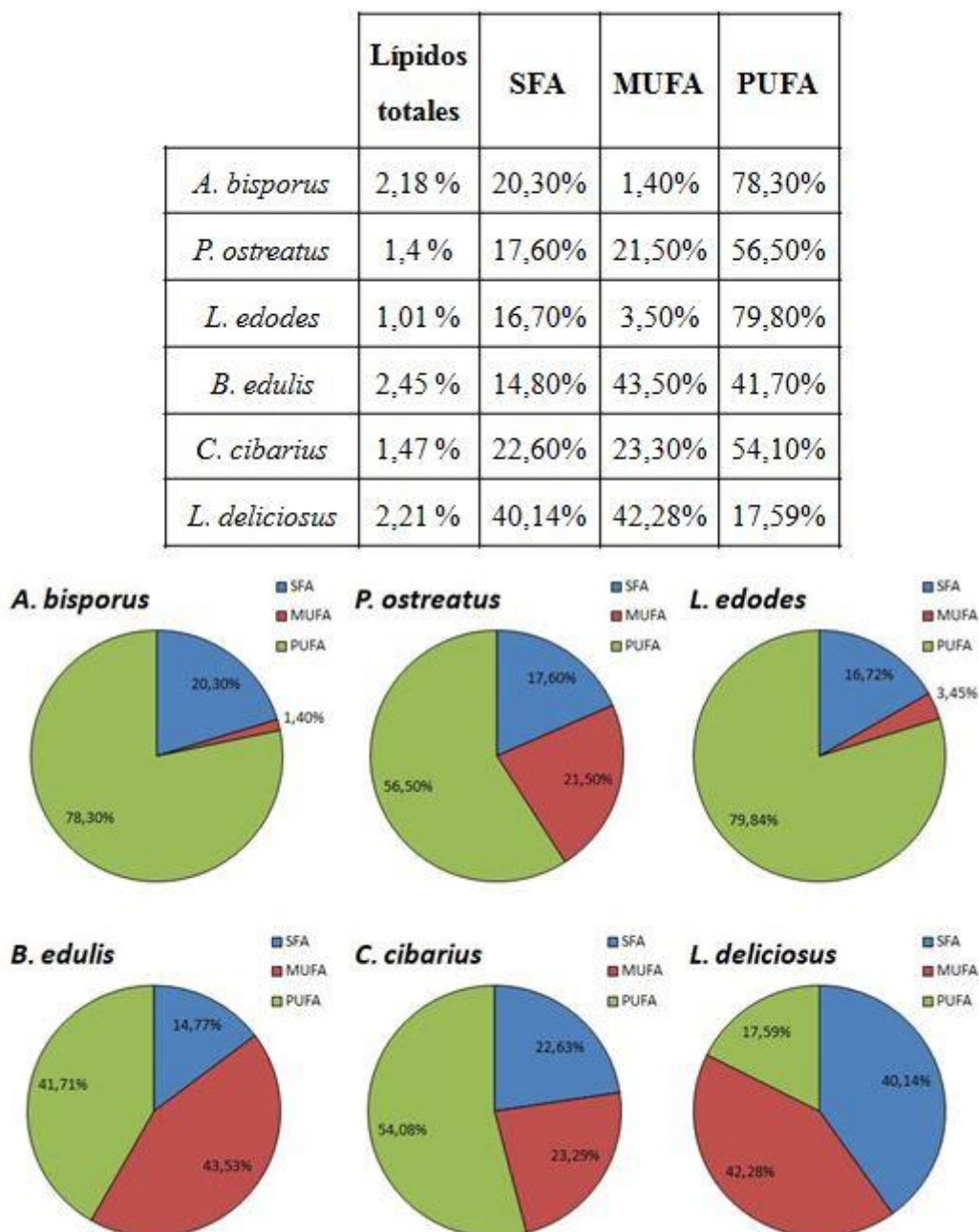


Figura-I.12. Ácidos grasos en hongos comestibles silvestres y cultivados
(Adaptado de: Barros y col., 2007a; Barros y col., 2008a; Heleno y col., 2011; Reis y col., 2012; Carneiro y col., 2013).

El principal lípido insaponificable presente en los hongos corresponde al ergosterol, el cual ejerce un papel esencial modificando la fluidez de la bicapa lipídica de la membrana celular y es clave en la adaptación de los hongos ante situaciones de estrés, variando su contenido. Según los datos encontrados en la bibliografía el contenido de ergosterol es del orden de los mg/g p.s., tanto en hongos silvestres como en cultivados, aunque con mayores valores en las especies cultivadas. Numéricamente, estos valores van desde los 2,96-4-89 mg/g p.s. para hongos silvestres a los 6,33-7,46 mg/g p.s. en las principales especies cultivadas ([Mattila y col., 2002a](#); [Kalac, 2009](#); [Phillips y col., 2011](#)). El contenido en ergosterol depende mucho de las condiciones en las que se encuentre el hongo, así durante el crecimiento vegetativo los niveles de ergosterol pueden ser superiores debido a la producción de biomasa y estabilizarse tras la fructificación ([Carrillo y col., 2004](#); [Bellettini y col., 2019](#)).

En cuanto a las propiedades beneficiosas para la salud del ergosterol, en apartados posteriores se profundizará sobre el tema, sobre todo en su fotoconversión en Vitamina D2.

Otro grupo importante, desde un punto de vista beneficioso para la salud, lo constituyen los tocoferoles, compuestos liposolubles formados por un anillo de cromanol y una cadena de fitol de 16 carbonos (ver Figura-I.13), que pueden presentar actividad de Vitamina E. En hongos pueden encontrarse α -, β -, γ - y δ - tocoferoles en órdenes de $\mu\text{g/g}$ p.s. aunque no necesariamente todas las formas están presentes. Los valores de referencia que menciona la bibliografía se encuentran entre 0,18 y 10,65 $\mu\text{g/g}$ p.s., dándose los valores totales más elevados en *B. edulis* y *C. cibarius* ([Barros y col., 2008a](#); [Jawoska y col., 2012](#); [Jaworska y col., 2015a,b](#)).

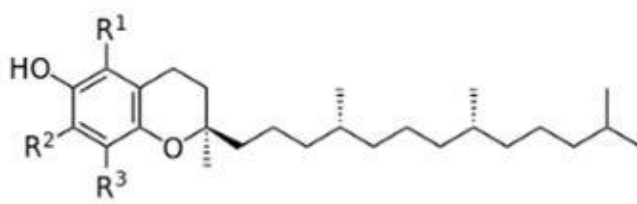
	R ¹	R ²	R ³	
α -tocopherol	CH ₃	CH ₃	CH ₃	
β -tocopherol	CH ₃	H	CH ₃	
γ -tocopherol	H	CH ₃	CH ₃	
δ -tocopherol	H	H	CH ₃	

Figura-I.13. Estructura de los principales tocoferoles presentes en hongos comestibles.

El tipo de tocoferol parece ser específico de la especie así como de la parte del carpóforo analizada. En *Clitocybe máxima* la forma dominante en el sombrero es el γ -tocoferol mientras que en el pie es δ -tocoferol (Tsai y col., 2009).

En cuanto a la estabilidad de estos componentes, se ha descrito que durante el proceso de secado de los hongos pueden tener lugar importantes pérdidas del contenido en todas las formas de tocoferol, así como una pérdida adicional durante el almacenaje (Jawoska y col., 2012).

Respecto a las especies *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *B. edulis* se han encontrado valores de tocoferoles totales de $3,17 \pm 0,21$, $2,87 \pm 0,24$, y $4,94 \pm 0,42$ mg/100g de p.s., respectivamente, teniendo actividad antioxidante (Vitamina E) gran parte de los mismos (Jaworska y col., 2015a,b). Puesto que la dosis diaria recomendada está estimada para los adultos entre 12 y 15 mg al día el consumo de estos hongos por esta vitamina no es una fuente tan rica como otros aceites vegetales (38 - 15 mg/100g) (Desai y col., 1988) o frutos secos (40-5 mg/100g p.f.) (Stuetz y col. 2017).

Aunque no es frecuente, en algunas especies con cuerpos fructíferos anaranjados, como *C. cibarius*, se han detectado niveles de β -caroteno entre 1,88 y 50 $\mu\text{g/g}$ p.s. y de licopeno entre 0,69 y 4,7 $\mu\text{g/g}$ p.s. (Barros y col., 2007b; Barros y col., 2008a,b; Tsai y col., 2009).

Teniendo en cuenta que la dosis diaria recomendada de carotenos o provitamina A (Retinol) es de 900 $\mu\text{g/día}$ para hombres y 700 $\mu\text{g/día}$ para mujeres y 400 $\mu\text{g/día}$ para niños entre 9 y 13 años (Stinco y col., 2019), los hongos no sería una buena fuente de Vitamina-A, ya que estas dosis pueden conseguirse más fácilmente, por ejemplo., con 100 g de zanahorias (835 $\mu\text{g/100g}$ p.f.). Tampoco son una buena fuente de licopeno ya que 100 g de tomate llegan a contener 2,5 mg de licopeno (USDA, 2004). Tras esta comparativa queda claro que los hongos comestibles pueden contener niveles detectables de vitamina E, β -caroteno y licopeno, pero que un consumo regular no cubre las necesidades correspondientes a sus dosis diarias. Sin embargo, su contenido en ergosterol y su potencial fotoconversión a vitamina D₂, sí satisfaría la correspondiente dosis diaria de Vitamina-D, como más adelante, en la presentación de nuestros datos, discutiremos.

1.3.3.4. Vitaminas hidrosolubles

Considerando los requerimientos de las vitaminas hidrosolubles para el ser humano, los hongos comestibles son una buena fuente para algunas vitaminas hidrosolubles. Pese a que la distribución varía entre las especies, aquellas con contenidos elevados podría cubrir una parte considerable de la demanda diaria (ver Tabla-I.7).

Tabla-I.7. Valores de algunas vitaminas hidrosolubles en hongos comestibles por 100g de p.s. (Adaptado de [Furlani y Godoy, 2008](#); [Jaworska y col., 2015a,b](#))

	Tiamina (B1)	Riboflavina (B2)	Niacina (B3)	Ácido ascórbico (C)
<i>A.bisporus</i>	0,09 mg	5,54 mg	23,52 mg	10,6 mg
<i>P. ostreatus</i>	0,30 mg	1,62 mg	9,98 mg	9,1 mg
<i>L. edodes</i>	0,07 mg	0,43 mg	-----	-----
<i>B. edulis</i>	0,94 mg	2,57 mg	22,89mg	29,9 mg
DDR	1,5 mg	1,5 mg	12-16 mg	100 mg

(DDR: dosis diaria recomendada)

Estos datos nos indican que los hongos y setas comestibles no son las mejores fuentes de vitaminas hidrosolubles para cubrir las dosis recomendables diaria, pero si contribuyen a cubrir estas necesidades en algunos casos como para las vitaminas del grupo B (especialmente B2, B3 y B9).

- Tiamina (Vitamina-B1)

Para un adulto de unos 70 Kg de peso la recomendación para la vitamina B1 o tiamina es de 1,5 mg/día. Aunque las especies cultivables presentan valores entre 7 y 30 µg/100g de p.h., es posible encontrar valores de hasta 94 µg/100g de p.h., en *B. edulis*, lo que supondría un 0,6% de la dosis diaria recomendada en una ración ([Furlani y Godoy, 2008](#); [Jawoska y col. 2015a,b](#)). Alimentos como la carne magra de cerdo puede contener hasta 0,89 mg/100g de p.h. y los productos integrales y las legumbres presentan valores entre 0,5 y 0,25 mg/ 100g de p.h. siendo fuentes mucho mas ricas que los hongos comestibles para esta vitamina.

– Riboflavina (Vitamina- B2)

Algunos autores consideran que los hongos comestibles cultivados son una mejor fuente de Vitamina-B2 o riboflavina que muchas verduras y vegetales. *A. bisporus*, *L. edodes* y *P. ostreatus* presentan valores entre 0,043 y 0,554 mg/100g de p.h. Con una ración de *A. bisporus* podría cubrirse un 30% de la dosis diaria recomendada de 1,5 mg, lo que es equiparable a 100g de huevos (0,457 mg/100g) o queso (0,298-0,488 mg/100g) y superior a la misma cantidad de leche y sus derivados (Mattila y col., 2001; Furlani y Godoy, 2008; Jawoska y col., 2015a).

- Niacina (Vitamina- B3)

El contenido en niacina de los hongos comestibles analizados está entre 0,998 y 2,352 mg/g de p.h., (Jawoska y col. 2015a,b), aunque otros autores han encontrado niveles superiores: 3,1-6,5 mg/100g p.h. (Çaglarirmak y col., 2009). Puesto que las recomendaciones para un adulto se estiman entre 12 y 16 mg/día incluso las medidas más conservadoras suponen un aporte entre el 14 y el 20% de la dosis diaria de niacina por ración.

- Ácido fólico (Vitamina- B9)

En los hongos comestibles, al igual que en los vegetales, el ácido fólico se encuentra en forma de folatos, habiéndose encontrado valores del orden de: 30 - 64 µg/100g p.h. Además, su biodisponibilidad parecen ser tan buena como la del ácido fólico a diferencia de lo que ocurre con los folatos presentes en algunos vegetales, guisantes y espinacas, p. ej., que son significativamente menos biodisponibles que el ácido fólico (Mattila y col., 2001). La dosis diaria recomendada para un adulto es de 400 µg/día aunque durante los embarazos se recomienda aumentar la ingesta a 600 µg/día así una ración podría cubrir del 7,5 al 16% de la dosis habitual y podría emplearse como una fuente adicional en los requerimientos durante la gestación.

– Ácido ascórbico (Vitamina C)

La concentración de Vitamina C o ácido ascórbico en hongos comestibles cultivados, según datos recientes, varía según la especie entre 0,91 y 2,99 mg/100g p.h. (Jawoska y col. 2015a,b). Otro autores han encontrado valores superiores, hasta de 14,4 mg/100g de p.h. (Mattila y col., 2001; Çaglarirmak, 2007). Estas diferencias podrían

explicarse en base a la técnica empleada para la cuantificación del ácido ascórbico. Los valores más altos se han obtenido mediante la cuantificación con el reactivo 2,6-dicloroindofenol que también es capaz de interactuar con taninos, compuestos sulfidrilos y metales como el cobre, hierro o cobalto, generando falsos positivos ([Arya y col., 1998](#)), mientras que los valores más recientes se han obtenido con técnicas cromatográficas.

Según las últimas recomendaciones sobre la ingesta de Vitamina-C, se recomienda tomar 80 mg diarios, siendo preferible tomar de 100 a 200 mg diarios, ya que así se alcanza la saturación plasmática ([Carr y Maggini, 2017](#)). Por lo que una ración de hongos podría suponer entre 1 y el 3% de la ingesta diaria de Vitamina-C. La abundancia de vitamina en frutas y verduras como el kiwi (65,5 mg/100g p.h.) ([Nishiyama y col., 2004](#)) o el brocoli (91,5 mg/100g p.h.) ([Favell, 1998](#)) muestra claramente que son mejores opciones para la obtención de esta vitamina.

Pese a que los hongos comestibles no son excepcionales en el aporte vitamínico, especialmente para las vitaminas B1 y C, suponen una fracción relevante para las otras vitaminas del grupo B comentadas (B2, B3 y B9) y una ración puede contribuir a satisfacer los requerimientos en una dieta equilibrada.

1.3.3.5. Ácidos orgánicos y compuestos fenólicos

Los hongos contienen cantidades importantes de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos.

En cuanto a los **ácidos orgánicos** que se encuentran en los hongos comestibles destacan los ácidos málico y quínico que constituyen entre el 35 al 84% del total, seguidos por el ácido cítrico que llega a representar del 9 – 10%, aunque también es frecuente la presencia de ácido oxálico y fumárico ([Ribeiro y col., 2006](#)).

En cuanto a los **compuestos fenólicos**, estos presentan una amplia diversidad. Así, en los hongos comestibles se han descrito los siguientes ácidos: p-hidroxibenzoico, tánico, gálico, protocatechuico, gentísico, vanílico, sirínico, cafeico, coumárico, ferúlico y cinámico; encontrándose valores entre 4,89 y 15,54 mg/g p.s., ([Puttaraju y col., 2006](#); [Ribeiro y col., 2006](#)).

En *A. bisporus* es el hongo comestible en el que más detalladamente se han estudiado los metabolitos secundarios, y en particular los metabolitos de naturaleza fenólica. Según la bibliografía la mayor parte de ellos generados a lo largo de la ruta del ácido siquímico (o shikímico), la cual es importante en la síntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano. La abundancia de estos aminoácidos aromáticos, y de ácidos fenólicos como los ácidos cinámico, *p*-hidroxibenzoico, protocatechuico y cafeico, (Soler-Rivas y col., 1998; Soler-Rivas y col., 1999; Mattila y col., 2001) (Figura-I.14) indican un entramado sistema de defensas contra plagas.

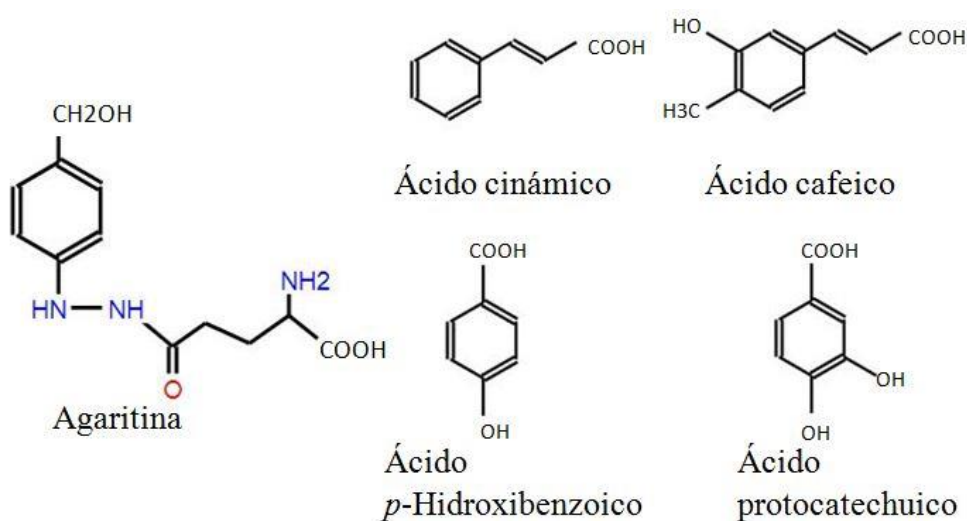


Figura-I.14. Estructura química de algunos compuestos fenólicos implicados en el metabolismo secundario de defensa identificados en *Agaricus bisporus*.

Entre los metabolitos secundarios implicados en la defensa destaca la agaritina (γ -L(+)-glutamil-4-hidroximetilfenilhidrazina). Este compuesto aparece en la epidermis de los cuerpos fructíferos y se encuentra a una concentración media de 15 $\mu\text{mol/g p.s.}$ = 4009,2 $\mu\text{g/g p.s.}$, = 4 mg/g p.s.

La agaritina también ha sido motivo de controversia por haberse considerado tóxica y/o cancerígena en los años 1970 en diferentes estudios en ratones (Shephard y col., 1995). Sin embargo, estudios posteriores no han mostrado resultados concluyentes. El test de Ames muestra posible mutagenicidad en bacterias pero no se ha logrado la inducción de tumores en modelos animales. Además, hoy día el consumo de hongos puede considerarse seguro, especialmente tras la recomendación de no consumir hongos

crudos, ya que la cocción degrada hasta el 90% de este compuesto (**Roupas y col., 2010**).

Por otro lado, estudios de toxicidad aguda (5.000 mg/Kg de peso) y sub-crónica (250-500 mg/kg peso, durante 28 días) corroboran no solo la ausencia de toxicidad, si no que confirman la ausencia de daño histológico en todos los tejidos, observándose sólo una mínima alteración puntual en el hematocrito que no se reproduce en el grupo de mayor duración (**Carbonero-Aguilar y col., 2018**).

1.3.3.6. Minerales

Los hongos y setas comestibles se consideran buenas fuentes de oligoelementos minerales. En la Tabla I.8 se muestra el contenido en Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn y Cu para los principales hongos y setas comestibles. Debido al importante contenido en K, Mg, Fe, Zn y Cu y sobre todo a su bajo contenido en Na, hace de ellos unos productos beneficiosos para el tratamiento y prevención de la hipertensión. También se ha reportado niveles de P, entre 61 y 1,4 (**Kalac, 2009**), si bien estos niveles están bastante alejados de la dosis diaria recomendada: 1.250 mg/día.

Si bien, en relación con este tema, el aspecto más importantes de los hongos y setas comestibles, es su capacidad para bioconcentrar determinados elementos, fundamentalmente Se y Li. Lo que permite la obtención de hongos o setas comestibles enriquecidas en selenio (**Cremades y col., 2012; Rathore y col., 2018; Prange y col., 2019**) o en litio (**Mleczek y col., 2017b**), de manera sencilla, por simple suplementación del medio de cultivo o compost con selenito de sodio o con sulfato de litio, respectivamente.

Los hongos enriquecido en selenio son capaces de aumentar la actividad de la glutatión S-transferasa (GST) en hígado y mama, lo que produce una respuesta en la capacidad antioxidante que podría utilizarse como un método de control en la formación de tumores inducidos químicamente. (**Spolar y col., 1999; Falandysz, 2008**). Un caso similar se produce ante la bioacumulación de Litio, en el que el consumo de hongos enriquecidos en litio podría paliar los efectos en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o el parkinson.

Tabla-I.8. Composición elemental de los principales hongos comestibles en mg por 100g de p.s. (Adaptado de: [Akyüz y col., 2010](#)¹; [Mleczek y col., 2017a](#)²; [Jedidi y col., 2016b](#)³).

	Ca	Mg	K	Na	Fe	Zn	Cu
<i>A. bisporus</i> ¹	20	40	4560	40	17,65	3,8	2,15
<i>P. ostreatus</i> ¹	20	90	1410	30	64,7	3,8	0,65
<i>L. edodes</i> ²	27,4	0,2	2626,3	12,3	6,75	10,7	1,34
<i>B. edulis</i> ³	4,08	226,7	16,31	461	0,27	63,1	21,5
<i>C. cibarius</i> ³	14,28	593,8	2082	308	1,68	1,04	3,27
DDR	1000	375	2000	<2300*	14	10	1

(*La DDR del Na hace referencia a la ingesta máxima recomendada).

1.3.3.7. Flavonoides. ¿Productores o Bioacumuladores?

La existencia de flavonoides en los hongos, durante bastante tiempo, ha sido materia de cierta controversia. Así, diferentes autores presentaron resultados en los que se mostraban elevados niveles de flavonoides en hongos silvestres. ([Choi y col., 2006](#); [Barros y col., 2007b](#); [Barros y col., 2008a](#); [Lim y col., 2007](#); [Turkoglu y col., 2007](#); [Sarikurkcü y col., 2008](#)). Los resultados obtenidos por estos autores se basaban en la cuantificación de flavonoides totales por un método colorimétrico ([Zhishen y col., 1999](#)), basado en la interacción del cloruro de aluminio (AlCl₃) con los flavonoides para formar un compuesto de color rosado detectable a longitud de onda de 510 nm. No obstante, pese a que el método fue validado en moreras (*Morus alba*), donde los compuestos fenólicos son mayoritariamente flavonoides, en hongos, como se ha mencionado previamente, existe una mayor heterogeneidad de compuestos que pueden interferir en el análisis.

La formación del compuesto coloreado, detectable a 510 nm, se produce por la reacción entre el AlCl₃ y los grupos hidroxilos en posición *orto* próximos a grupos cetónicos, lo que indica la posibilidad de interacciones con compuestos de naturaleza no flavonoide, como por ejemplo el L-DOPA ([Nikolovska-Coleska y col., 1995](#)). La detección específica de flavonoides mediante HPLC-MS respalda la no-producción de flavonoides por los hongos ([Ribeiro y col., 2006](#)).

¿Por qué entonces en algunos casos es posible detectar la presencia de flavonoides en hongos?

En una publicación reciente se pone clamente de manifiesto que en determinadas especies de hongos y bacterias relacionadas con la rizosfera de plantas es posible detectar la presencia de flavonoides ([Gil-Ramirez y col. 2016](#)), si bien, esto parece ser debido a un proceso de bioacumulación de estos metabolitos en el hongo por toma/difusión desde la planta, más que a una síntesis propia. Por lo que es posible encontrar hongos enriquecidos en flavonoides. En estos casos la determinación del contenido en flavonoides es recomendable hacerlo por HPLC-MS en vez de mediante el método colorimétrico.

Pese a todo la USDA no reconoce a los hongos como fuente de flavonoides para la alimentación ([Iwalokun y col. 2007](#)), y en cierto sentido es lógico, ya que los hongos carecen de la maquinaria enzimática necesaria para su biosíntesis.

1.4. LOS HONGOS COMO FUENTE DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son una categoría de alimentos de elevado interés en la industria agroalimentaria con una popularidad creciente en la población. Se originaron en Japón en los años 80 como una medida del gobierno para reducir el gasto en salud pública ([Saito, 2007](#)) y desató un gran interés a nivel mundial. Durante bastante tiempo la aplicación del término "alimento funcional" se empleó de manera amplia para gran parte de los alimentos y sus derivados que presentaban, potencialmente, determinados beneficios sobre la salud humana.

Desde 2006 la Unión Europea dispone de un reglamento específico ([CE nº 1924/2006 del Parlamento Europeo del 20 de diciembre de 2006](#)) relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos, en las que las alegaciones de propiedades saludables para dicho alimento, deberán estar respaldadas por rigurosos estudios científicos ([Art 58 de la ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición](#)). Dicho reglamento se mantiene vigente, con actualizaciones periódicas a fecha de 2018.

La consideración de "funcional" para un alimento es otorgada si se demuestra satisfactoriamente que, además de su efecto nutritivo, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo mejorando el estado de salud o bienestar o reduce el

riesgo de enfermedad (**Diplock y col., 1999; Reis y col., 2017**). La definición propuesta por el FUFOSE (Functional Food Science in Europe), destaca tres aspectos importantes:

- i) El efecto funcional es distinto del nutritivo.
- ii) El efecto funcional debe estar demostrado científicamente.
- iii) El efecto puede consistir en una mejora de las funciones fisiológicas, en una reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad o ambas.

Esta definición, si bien es amplia debe ir acompañada de ciertas premisas, entre las que destacan:

- i) El alimento funcional debe ejercer su función en el organismo cuando se ingiere en cantidades normales de consumo.
- ii) El alimento funcional debe mantener tanto la estructura como la forma de un alimento.

Ante las situaciones en las que se cumplan los aspectos de funcionalidad pero se incumplan las premisas se estableció el término “nutraceútico”. Por ejemplo cuando se trata de preparados con actividad funcional beneficiosa para el organismo, pero que no respetan la presentación y estructura de un alimento convencional como preparados en polvo, comprimidos, cápsulas, extractos, siropes, y otras presentaciones no habituales que se pueden consumir como tales o incorporados en alimentos. Por ello, es frecuente que los nutracéuticos sean empleados como suplementos alimenticios, por ejemplo, para complementar determinados tipos de dietas aunque también son empleado como coadyudantes de medicamentos (**Valenzuela y col., 2014**).

Es común encontrar aplicaciones de alimentos funcionales o nutraceuticos como complementos dietéticos aunque estos últimos se refieran a un grupo de productos con normativa y aplicaciones diferentes, dando lugar a discusiones sobre su marco legal (**Santini y col., 2018**). Una propuesta que ayude a comprender las distinciones sitúa a los nutraceuticos más próximos a los medicamentos mientras que los alimentos funcionales se encontrarían más próximos a los alimentos (Figura -I.15)

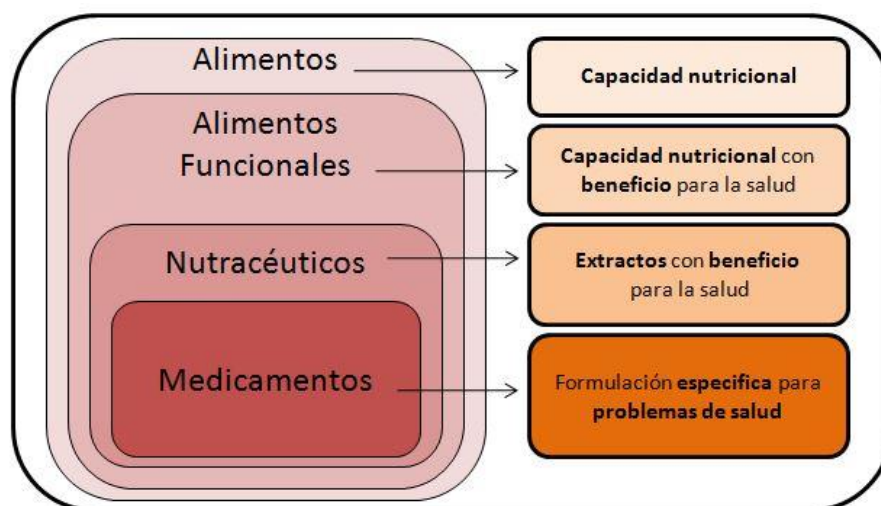


Figura -I.15. Diferencias principales entre alimentos, alimentos funcionales, nutraceuticos y medicamentos

Ante la creciente concienciación de la población sobre la relación entre la alimentación y la salud, el mercado de los alimentos funcionales y los nutraceuticos se encuentra en crecimiento debido a esta demanda. Es posible encontrar margarinas enriquecidas con esteres de fitoesteroles y otros compuestos capaces de reducir los niveles de colesterol en el organismo, aceites de girasol enriquecidos en acido oleico mas beneficioso ante el riesgo de enfermedades cardiovasculares, yogures pre y probioticos para mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal e infinidad de productos recomendados para la hipertensión, enfermedades vasculares, metabolismo graso y antienvjecimiento, principalmente gracias a antioxidantes naturales.

Los hongos también presentan compuestos con propiedades bioactivas de interés médico-farmacéutico (Tabla -I.9). Esto da lugar a productos formulados en base a estos organismos aunque también extractos o productos purificados pueden añadirse a otros tipos de alimentos para dotarles del beneficio adicional de estos compuestos. (Corrêa y col., 2017) Así mismo es posible encontrar en el mercado tanto nutraceuticos basados en las propiedades de los compuestos como formulaciones que integran uno o más hongos en su totalidad. A menudo estas formulaciones son patentadas y explotadas comercialmente. Puesto que los organismos no pueden ser patentados las patentes derivadas suelen proteger la composición concreta de un producto, el método de su comercialización (formato pastilla, sirope, polvo), o la maquinaria y la metodología de su producción.

Tabla-I.9. Propiedades bioactivas de algunos hongos (adaptado de [Rathore y col., 2017](#))

Hongo	Moléculas bioactiva	Propiedades
<i>Agaricus bisporus</i>	Lectinas	Favorece la secreción de insulina.
<i>Auricularia auricula</i>	Polisacáridos ácidos	Actividad antitumoral, reducción de colesterol, triglicéridos, y glucosa en sangre.
<i>Cordiceps sinensis</i>	Cordycepina	Tratamiento de infecciones pulmonares, actividad hipoglucémica y antidepresivo.
<i>Flammulina Velutipes</i>	Polisacáridos, peptidoglicanos, prolamina y proflamina	Antioxidantes, anticancerígena inmunomoduladora y antiviral.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Polisacáridos triterpenoides, Ácido ganoderico y betaglucanos	Potenciación del sistema inmune e inmunomodulador, Hepatoprotector, inhibidor de la síntesis de colesterol,
<i>Lentinula edodes</i>	Eritadenina, Lentinan	Reduce el colesterol y actividad anticancerígena.
<i>Pleurotus Sajor-caju</i>	Lovastatina	Disminuye el colesterol y previene trastornos cardiovasculares.

Dichas patentes son más comunes en el mercado asiático donde los hongos gozan de una mayor popularidad como productos saludables mientras que en Estados Unidos y Europa están más relegados a ámbitos nutricionales. Algunos productos que muestran la discrepancia en el formato son las bebidas saludables que contiene un extracto antioxidante del hongo *Formes japonicus* de la firma Mishima Foods Co. Ltd en 2002 ([Patente japonesa, 2002](#)) o las bolsas de té de setas para potenciar el sistema inmune de la empresa china Jiangsu Anhui Bio Tech Co Ltd en 2019 (registro en la oficina de patentes europea: WO2019024011 (A1)) frente al uso de extractos de *Lentinula* sp. ricos en eritadenina para la producción de alimentos que reducen el nivel de colesterol en sangre por la empresa Finlandesa Eritocap OY ([Patente USA, 2004](#)) (ver Tabla I.10). También existen algunas compañías que ofrecen extractos o preparaciones que contienen hongos para el diseño de nuevos alimentos funcionales (Tabla-I.11).

Dentro del mercado de los nutraceuticos derivados de hongos existe una gran gama de productos en forma de cápsulas, tabletas y gotas que gozan de gran popularidad en los Estados Unidos y Europa.

Los productos más populares y demandados son aquellos basados en extractos de *Ganoderma Lucidum* (Reishi), un hongo medicinal con una extensa historia en la medicina tradicional asiática. Entre las propiedades que se le atribuyen se encuentran actividades como: antioxidante, antitumoral, antiviral, inmunomodulatoria y reguladora del metabolismo graso como reductor del colesterol, etc. Los estudios científicos

realizados sobre otras especies de hongos han permitido la formulación de nuevos productos basados en otros hongos, ampliando el mercado ([Wachtel-Galor y col., 2004](#)).

De forma similar a los nutraceuticos los hongos se pueden encontrar como aditivos en alimentos como el café (Ganocafé de Gano Excel colombia) con formulaciones de uno o varios hongos como *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazeii* o *Corcicordyceps*.

El gran atractivo de estos hongos como suplementos o nutraceuticos son las diversas propiedades beneficiosas para la salud ya descritas en las propiedades bioactivas de los hongos comestibles. Solo de los polisacaridos aislados de distintos hongos se han descrito numerosas actividades activadoras del sistema inmune, propiedades antiviricas y antibacterianas, actividades inmunomoduladoras y anticancerigenas asi como antioxidantes (Peroxidación lipidica y hepatoprotectora) e incluso como tratamientos antiedad ([Rathore y col., 2017](#)).

Los estudios de determinados compuestos o fracciones derivados de hongos comestibles sobre la salud han permitido vincular las propiedades bioactivas que se le atribuyen a uno o varios compuestos ([Chihara, 1992](#)). Así en el libro, "Los hongos como alimentos funcionales" ([Cheung, 2008](#)), se recopila un gran numero de estudios sobre estos compuestos y se proponía la utilización de los mismos como alimentos funcionales.

El análisis detenido de la información discutida, indica que la mayoría de los alimentos funcionales o nutraceuticos de hongos y setas comestibles están basados en el uso de extractos o productos más o menos purificados, los cuales se integran en una formula o alimento convencional para mejorar sus propiedades y generar un valor añadido.

Sin embargo, los hongos por sí mismo también podrían constituir un alimento funcional, ya que contienen determinados componentes con bio-actividades beneficiosas para la salud (ergosterol, ergotioneina, vitaminas...), siempre y cuando estos componentes estuvieran presentes a unas concentraciones adecuadas.

El caso más directo es el del ergosterol, precursor de la vitamina D2, ya que la transformación del ergosterol en vitamina D2 por exposición a la luz UV podría

permitirnos la obtención de hongos y setas enriquecidos en dicha vitamina y si la concentración es la adecuada, conseguir la dosis diaria mediante el consumo de una ración (aprox 100 g p.h.) sin modificar significativamente el formato de su comercialización habitual.

Tabla-I.10. Algunas patentes que incluyen hongos en su composición y alegan propiedades saludables para ser vendidos como alimentos funcionales.

Número de Patente	Año	Título	Ingredientes Funcionales
10/235829	2002	Bebidas con extracto de <i>Fomes japonicus</i> con miel y vinagre	Extracto de <i>Fomes japonicus</i> , miel y vinagre
11/257128	2005	Extractos de hongos con actividad anticancerígena	Extracto de micelio de <i>Ganoderma adspersum</i> , <i>Hypsizygus ulmarium</i> , <i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>Omphalotus olearius</i> , <i>Panus conchatus</i> , <i>piptoporus betulinus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> y <i>Trametes zonata</i>
WO/2006/071085	2006	Formulación de una tableta de leche con actividad inmunomoduladora y un método de preparación de la misma	Mezcla de extractos de <i>Acanthopanax senticosus</i> , <i>Radix adenophorae</i> , <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> .
WIPO- /WO2007/063158	2007	Alimento funcional con efectos positivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares	Mezcla de hongos incluyendo extractos de <i>Ganoderma</i> .
USPTO- 20080171103	2008	Alimento saludable y funcionales para pacientes con obesidad usando patata morada	Variedad específica de patata y glucanos de hongos.
US 20080254168	2008	Formulación de alimentos deshidratados	Extracto de <i>Lentinula edodes</i> .

Tabla-I.11. Compañías que comercializan ingredientes funcionales obtenidos a partir de los hongos.

Compañía	País	Ingrediente funcional
Hangzhou New Nutraceutical Co., Ltd	China	Extracto de una mezcla de hongos
Leili Natural Products Co., Ltd	Japón	Fuoidan (polisacarido obtenido de algas y <i>Agaricus sp.</i>)
High-Tech Victory Biology Engineering (zhuhai) Co., Ltd	India	Fructooligosacaridos de hongos (scFOS)
Shanghai Nicechem Co.Ltd	China	Quitosán, D-glucosamina HCl, n-acetil glucosamina
Garuda International INC.	Estados Unidos	Extractos de hongos (<i>Agaricus blazei</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Lentinula edodes</i> entre otros)

1.5 ERGOSTEROL Y VITAMINA D

El ergosterol es una molécula clave en las membranas de los hongos siendo esencial en el desarrollo y crecimiento celular. De forma homóloga al colesterol en animales, el ergosterol interviene en la fluidificación de la bicapa lipídica de la membrana y su importancia biológica la ha convertido en una diana molecular en compuestos antifúngicos (Bell, 2007). También desempeña un papel clave en la respuesta frente a estrés en hongos (Hagiwara y col., 2016).

Desde hace tiempo se ha podido observar que la abundancia del ergosterol presenta gran variabilidad entre especies, entre cepas de la misma especie e incluso, en especies cultivadas dependiendo de la composición del compost en el que crecen. Pese a la variabilidad apreciada, Es frecuente que el contenido en ergosterol sea mayor en los hongos cultivados (6,02 – 6,79 mg/g p.s.) que en los hongos que crecen libremente en la naturaleza (2,96 – 4,89 mg/g p.s.) (Mattila y col., 2002a) posiblemente debido a la presencia de un mayor metabolismo para el desarrollo de la biomasa debido a la abundancia de sustrato y a la reducida competencia por el mismo durante el procesamiento artificial del compost.

1.5.1 Biosíntesis de ergosterol

La biosíntesis de ergosterol en hongos en general y en hongos comestibles en particular está poco estudiada, habiéndose realizado la mayor parte de los estudios en levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*, y *Sacharomyces pombe*) y algunos hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, y *Aspergillus. Oryzae*) (Hagiwara y col., 2016). La biosíntesis de ergosterol es un proceso complejo en el que participan numerosas enzimas y en el que se consume una gran cantidad de energía. En levadura, donde la ruta ha sido más estudiada, la biosíntesis de una molécula de ergosterol desde dos moléculas de Acetil-CoA requiere del consumo de, al menos, 24 ATPs y 16 NADPHs (Hu y col., 2017).

La biosíntesis del ergosterol puede dividirse en tres módulos: biosíntesis de mevalonato, biosíntesis de farnesil-pirofosfato y biosíntesis de ergosterol (Figura-I.16). El primer módulo parte de dos moléculas de Acetil-CoA y concluye con la producción de una molécula de Acido mevalónico. Esta ultima reacción, catalizada por la enzima

HMG reductasa está considerada el primer punto de control de acceso a la ruta y es uno de los puntos importantes de regulación debido a que las estatinas inhiben la reacción. Esta etapa coincide con la síntesis del colesterol en animales por lo que esta regulación mediante estatinas se está utilizando como tratamiento para reducir el colesterol ([Tamargo y col, 2007](#)).

El segundo modulo cubre las reacciones desde la fosforilación del ácido mevalónico hasta farnesil-pirofosfato el cual actúa como precursor para otras rutas metabólicas como la síntesis de dolicol o la biosíntesis de ubiquinona (o coenzima Q10).

El tercer modulo parte de dos moléculas de farnesil-pirofosfato para sintetizar escualeno, el primer producto de esta etapa. Pese a que parte de la ruta sigue siendo común tanto para la síntesis de colesterol como para la de ergosterol, la diferenciación a partir del lanosterol permite una búsqueda más selectiva de inhibidores de la síntesis de ergosterol para encontrar compuestos con actividad antifúngica que puedan prevenir el desarrollo de hongos patógenos sin afectar la ruta del colesterol en animales. ([Pan y col., 2018](#)). Dado que la regulación de niveles de esteroides tiene una fuerte regulación transcripcional, traduccional y postraduccional ([Espenshade y Hughes, 2007](#)) se han identificado moléculas con actividad inhibidora de las reacciones de esta etapa como azoles (ERG11/ Citocromo P450 lanosterol α -demetilasa), o morfolidinas (ERG24/Esterol C14-reductasa y ERG2 / esteroide C8- isomerasa).

Del mismo modo estas enzimas presentan un interés adicional si se pretende potenciar la síntesis de ergosterol, aunque la sobreexpresión de enzimas clave como ERG6 (esteroide metiltransferasa) o ERG4 (C-24 esteroide reductasa) no es suficiente siendo necesario medidas adicionales para mantener una producción estable de ergosterol ([Polakowski y col. 1999](#); [He y col., 2003,2004,2007](#)).

La biosíntesis del ergosterol supone un marco específico para el desarrollo de fármacos antifúngicos tanto durante la síntesis con los inhibidores como azoles y morfolidinas ([Pan y col 2018](#)) como sobre el propio ergosterol integrado en la membrana. Los antimicóticos basados en macrolidos de polieno como la anfotericina B, nistatina o natamicina se unen al ergosterol debilitando la membrana y provocando una fuga de iones osmoreguladores (Na^+ y K^+) que contribuye a la muerte celular.

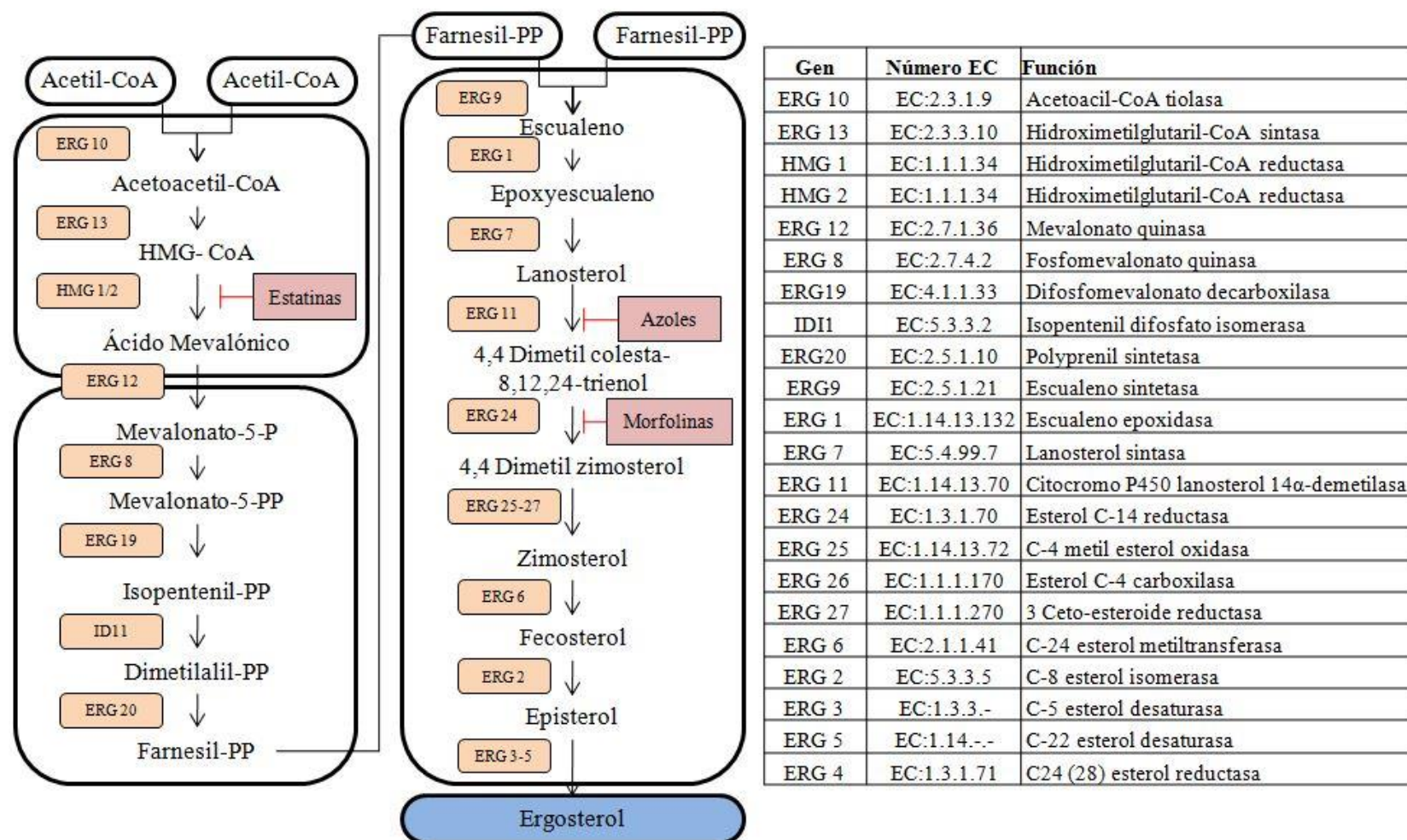


Figura-I.16. Biosíntesis de ergosterol en *S. cerevisiae* y enzimas implicadas (adaptado de [Hu y col., 2017](#)).

1.5.2 Aplicaciones del ergosterol; diana molecular, propiedades medicinales y precursor de nutraceuticos

Además de la importancia del ergosterol en el metabolismo de los hongos numerosos estudios proponen que este compuesto puede tener importantes aplicaciones en los campos de la industria, la medicina y la alimentación.

Puesto que el ergosterol es un esteroide específico de hongos suele emplearse como bioindicador de biomasa fúngica, así la medida de su contenido se utiliza en el control de fermentaciones de mostos y vinos, como indicador del grado de maduración en el que se encuentran (Porep y col., 2014), o en el control de productos frescos (almacenamiento de frutas y verduras) donde un incremento de su contenido es señal de contaminación y deterioro de los productos (Miyagawa y col., 2009). Así mismo también existen productos enriquecidos con fitoesteroides y micosteroides como leches enriquecidas, yogures, panes, mantequillas o zumos que presentan como un valor añadido debido a su beneficio en la prevención de hipercolesterolemia (Côrrea y col., 2017), es decir, a su uso como nutraceutico o alimento enriquecido.

En un estudio relativamente reciente se propone que extractos de *P. ostreatus* ricos en ergosterol ofrecen protección ante la oxidación lipídica mediante la captación de radicales libres y la inhibición de la ciclooxigenasa lo que sugiere que puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Schneider y col., 2011).

De gran interés es también el potencial uso del ergosterol en tratamientos contra el cáncer (Corrêa y col., 2017). Recientemente se ha considerado el ergosterol como un lípido inmunológicamente activo capaz de inducir la piroptosis (vía de muerte celular dependiente únicamente de la caspasa 1.) (Marcio, 2018). Li y colaboradores (2015) propone que la supervivencia prolongada en ratones con cáncer de mama se debe no solo a los polisacáridos con actividades antitumorales, sino también a la acción de una fracción de moléculas pequeñas liposolubles de la que el ergosterol es el componente mayoritario. Esta propuesta alega que el ergosterol puede ralentizar el desarrollo de un tumor mediante la regulación del receptor supresor tumoral Foxo3. Este receptor suele estar inactivo en la leucemia linfoblástica aguda resistente a terapia lo que implica que un tratamiento con ergosterol podría revertir la resistencia aumentando el rango de tratamientos efectivos.

Pese a la discrepancia en el mecanismo de acción también se ha registrado que en conjunción con tratamientos basados en anfotericina B se produce una sinergia en la actividad anticancerígena sobre carcinoma hepatocelular (Lin y col., 2017) por lo que es posible que existan múltiples interacciones viables para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer basados en el ergosterol.

Hay numerosos ensayos en los que el ergosterol o sus derivados han tenido un impacto significativo inhibiendo el desarrollo de tumores y controlando el proceso inflamatorio, regulando la síntesis de colesterol en modelos animales, e incluso desarrollando actividad antimicrobiana ante parásitos intestinales (la ameba *Entamoeba histolytica*) o el protozoo causante de la leishmaniasis (*Leishmania amazonensis*) (Corrêa y col., 2017).

Recientemente se ha descrito también el papel beneficioso del ergosterol en el tratamiento de la nefropatía diabética mediante la atenuación de la proliferación de células mesangiales y el depósito de matriz extracelular a través de la vía de transducción de señales TGF- β 1/Smad2 (Dong y col., 2019).

Además de las funciones previamente descritas, basadas en su presencia y/o en sus actividades fisiológicas, quizás la actividad o el potencial más relevante sea considerar su conversión a productos bioactivos. Entre los que destaca la fotoconversión en Vitamina-D2 por tratamiento o radiación con luz-UV (Kalaras y col., 2012a).

1.5.3 Vitamina D

1.5.3.1 Ergocalciferol y colecalciferol

La Vitamina D es un 9,10-secoesteroide descubierto en 1918 por E. Mellanby como resultado de sus estudios sobre el raquitismo, acuñando el papel principal de la vitamina D en su acción hormonal en el mantenimiento de la homeostasis del calcio, importante en la movilización, retención del calcio y fosforo en la remodelación ósea (Wagner y col., 2012).

Cuando se hace referencia a vitamina D frecuentemente se está considerando un grupo de vitaminas que exhiben actividades biológicas similares al colecalciferol (Vitamina D3) el cual se sintetiza en la piel de los animales al exponerse a la luz ultravioleta del sol. No obstante el metabolismo del ergocalciferol (Vitamina D2) se obtiene de forma similar en hongos y los animales son capaces de emplearlo indistintamente al colecalciferol con la única diferencia fisiológica de que es asimilado exclusivamente mediante la alimentación y no por síntesis endógena. La diferencia química entre ambas moléculas se reduce a la presencia de un doble enlace y un grupo metilo adicional en la vitamina D2 (ver Figura-I.17).

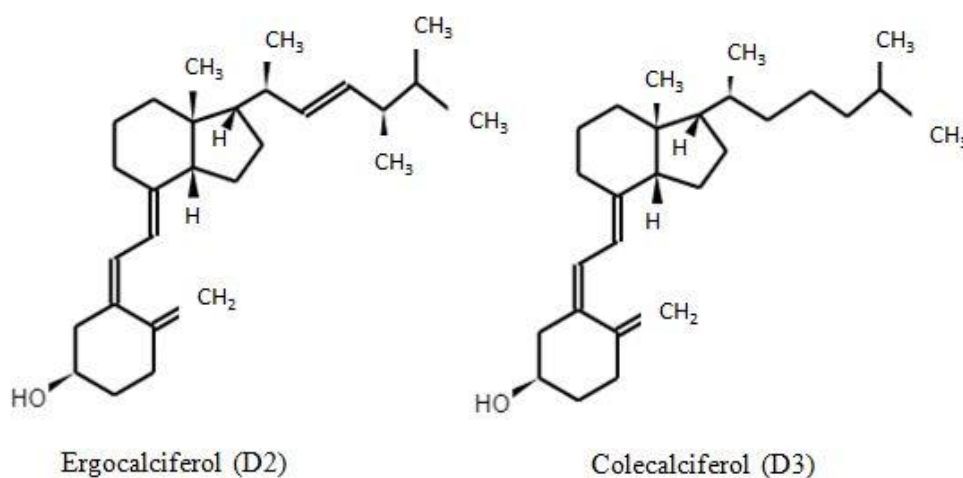


Figura-I.17. Diferencia en la estructura química entre Ergocalciferol (Vitamina D2) y Colecalciferol (Vitamina D3)

Además de la Vitamina D2 y D3 se han descrito otras formas, tales como la Vitamina D4 (22,23-dihidroergocalciferol), Vitamina D5 (sitosterol ó 24-etilcolecalciferol), Vitamina D6 (stigmasterol) y Vitamina D7 ((5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-campestatrien-3-ol) aunque solo las formas D2 y D3 tienen relevancia medico-nutricional para el ser humano.

La síntesis de la Vitamina D2 en hongos (y de Vitamina D3 en la piel humana) tiene lugar a través de una serie de reacciones fotoquímica y térmicas de la provitamina D (ergosterol y 7-dehidrocolesterol) en Vitamina D. Brevemente, la exposición de la provitamina D a la radiación ultravioleta en la región de 280-315 nm, conduce a la abertura del dieno 5,7 del anillo-B de la provitamina D para formar la pre-vitamina D. La longitud de onda óptima para producir Vitamina D es 296,5 nm. La pre-vitamina D

también puede absorber luz UV en la misma región, dando lugar a la formación por fotoisomerización de tachisterol o al cierre del anillo formándose provitamina D y lumisterol (**Kalaras y col, 2012b**). Seguidamente la previtamina D se isomeriza lentamente a Vitamina D vía reacción térmica. La proporción de productos de la fotorreacción una vez alcanzado el estado estacionario depende significativamente de la longitud de onda de la radiación, produciéndose a longitudes de onda cortas (248-254 nm) tachisterol como producto mayoritario, mientras que a longitudes de onda mayores (> 305 nm) se favorece la formación de provitamina D y lumisterol, ver Figura-I.18 (**Kalaras y col, 2012b**). Por otro lado, periodos largos de irradiación conducen a la formación de productos secundarios de reacción potencialmente tóxicos, toxiésteroles y supraesteroles (**Boomsma y col., 1977**).

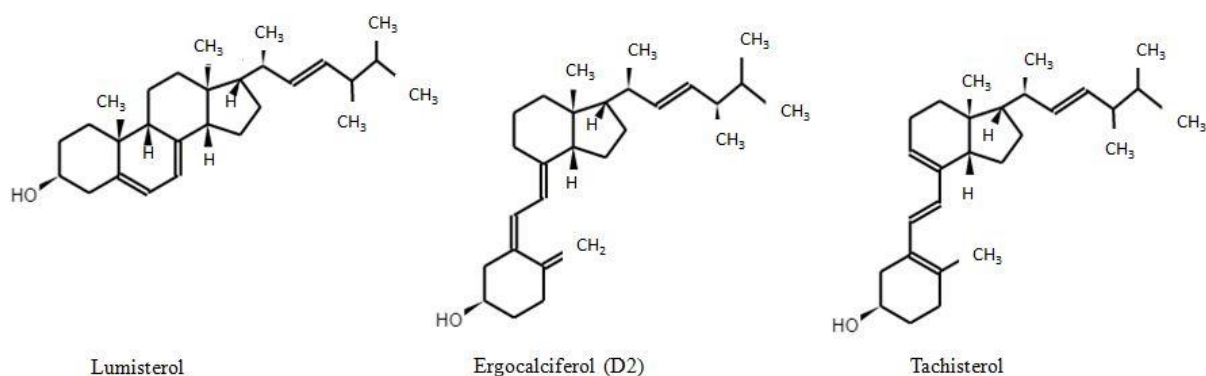


Figura -I.18. Diferencia en la estructura química entre Ergocalciferol (Vitamina D2) y Tachisterol y Lumisterol

En la preparación industrial de Vitamina D de grado alimentario, la producción de productos secundarios de fotorreacción se controla mediante la terminación del proceso de radiación a bajos niveles de conversión del material de partida (ergosterol). Por lo que los tratamientos de hongos, con luz UV, para enriquecerlos en Vitamina D, se llevan a cabo realizando tratamientos de corta duración (**Kalaras y col., 2012a**). Así en el análisis de hongos enriquecidos en Vitamina D2 mediante irradiación UV corta no se detecta la presencia de metabolitos no deseados tales como tachisterol o lumisterol (**Phillips y col., 2011;2012**). Aun así, por seguridad alimentaria, el control de estos posibles metabolitos no deseables debería ser una rutina en el control de calidad de este tipo de alimento funcional.

1.5.3.2 Metabolismo de la Vitamina D

Tanto la Vitamina D₂ como la D₃, son biológicamente inertes, y sólo se vuelven biológicamente activas tras una serie de reacciones de hidroxilación, que tienen lugar en el hígado y el riñón, convirtiéndose en 1,25-dihidroxitamina D, hormona responsable de las interacciones receptor dependientes de la Vitamina D en los tejidos correspondientes.

La síntesis endógena del organismo para la vitamina D₃ comienza con la fotoconversión del 7-dehidrocolesterol a calciferol (D₃) mediante irradiación ultravioleta en las células epiteliales, un proceso homólogo al producido en hongos de ergosterol a ergocalciferol (D₂). Esta síntesis ha sido considerada el principal método por el que el cuerpo obtiene este metabolito aunque se está reconsiderando el papel de ambas formas de vitamina D obtenidas mediante la dieta ([Cashman y col., 2014](#)). La adición de vitamina D₂ a productos cosméticos manifiesta que también es posible obtener ergocalciferol por uso tópico, pese a que el método más habitual sigue siendo la absorción intestinal ([Wedad y Hegazy, 2015](#)).

La dosis de Vitamina D presente en un alimento, alimento enriquecido o suplemento vitamínico no tiene porque corresponder con la dosis efectiva que recibe el organismo puesto que los procesos de cocción de los alimentos pueden generar una pérdida de este compuesto según la preparación ([Jakobsen y col., 2014](#)). También el compuesto debe superar todo el proceso de digestión a lo largo del tracto gastrointestinal y atravesar el epitelio intestinal para alcanzar la circulación sanguínea. Esta biodisponibilidad no suele considerarse ya la medida clínica de vitamina D en el organismo se realiza sobre la vitamina D activada y esta confluye tanto del factor dietético como de la síntesis endógena.

El ergocalciferol y el calciferol circulante en sangre se transforma en 25-hidroxitamina D (25(OH) D) en las mitocondrias de las células hepáticas mediante la Vitamina D 25-hidroxilasa ([Gupta y col., 2004](#)).

La 25-hidroxitamina D o calcidiol considera una forma poco activa con actividad autocrina y paracrina en los tejidos que presentan receptores de la vitamina D (RVD) los cuales abundan en los órganos implicados en el metabolismo del calcio.

En el riñón la 25-hidroxivitamina D se convierte en su forma activa, 1,25 dihidroxivitamina D o calcitriol la cual estimula la reabsorción glomerular de calcio y fósforo. Del mismo modo actúa como su predecesor en los tejidos que presentan RVD, estimulando la absorción de calcio y fósforo en el intestino o su reabsorción en los huesos. La Hormona Paratiroidea (PTH) ante niveles bajos de 1,25(OH)₂D activa en el riñón la enzima 1- α hidroxilasa y ante niveles altos de 1,25(OH)₂D reduce la secreción de PTH. En el tejido óseo, el incremento de 1,25(OH)₂D induce la secreción del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) el cual actúa como inhibidor de la enzima 1- α hidroxilasa lo que lleva a un descenso en la concentración de 1,25(OH)₂D libre. Los niveles de calcio y fósforo complementan la regulación de estos mecanismos a altas concentraciones (Bover y col., 2015) (ver Figura-I.19).

Es destacable mencionar que en la bibliografía no se suele diferenciar entre la 1,25-hidroxivitamina D proveniente de D2 de la D3 ya que ambas poseen las mismas propiedades funcionales pese a que las moléculas de D2 siguen conservando el doble enlace y el grupo metilo adicional y es posible diferenciar ambas formas mediante radioinmunoensayo (Hollis y col., 1993) y/o técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masa (nLC-MS/MS) (Mena-Bravo y col., 2015).

1.5.3.3 Importancia clínica de la Vitamina D

Actualmente se sabe que la Vitamina D además de su papel central en el metabolismo fosfocálcico óseo, también tiene otras importantes aplicaciones clínicas (Holick, 2009) como por ejemplo en el cáncer (Zittrermann, 2003), enfermedades coronarias (Forman y col., 2013); diabetes (Mathieu, 2015); obesidad (Cipriani y col., 2014). Además de los anteriores casos, deficiencias en Vitamina D se han descrito también en casos de artritis (Bellan y col., 2015), hipertensión (Burris y col., 2014), psoriasis (Filoni y col., 2018) etc.

Las evidencias indicadas sugieren que la deficiencia en Vitamina D no sólo está asociada con enfermedades óseas sino que también lo está con un amplio abanico de enfermedades crónicas. Por lo que el mantenimiento de unos niveles sanos de Vitamina D podría ser de una gran utilidad en la prevención de un amplio espectro de enfermedades crónicas.

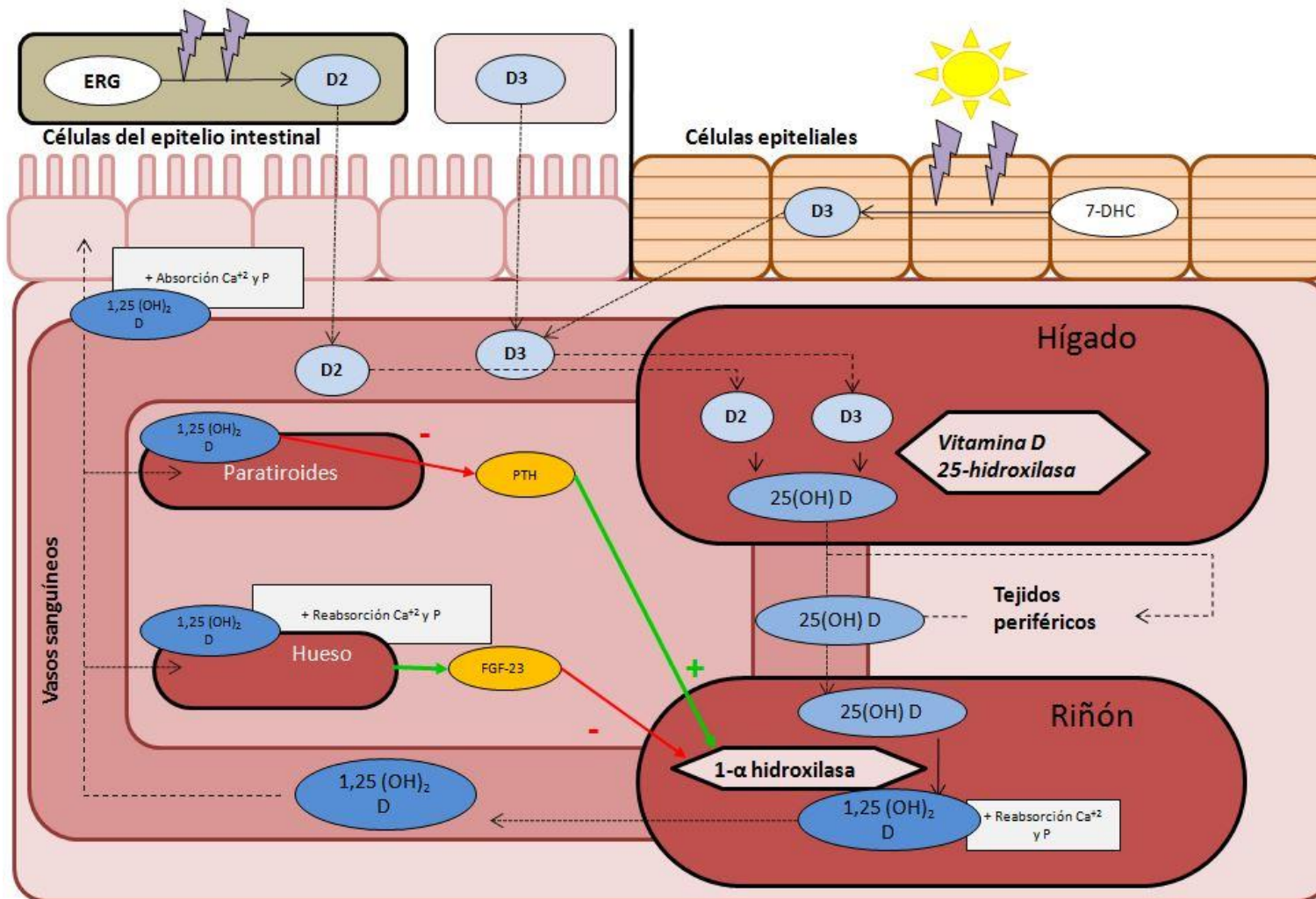


Figura -I.19. Metabolismo simplificado de la Vitamina D en el organismo.

Aunque algunos investigadores han comunicado que la Vitamina D3 administrada a altas dosis es biológicamente superior a la Vitamina D2 (Shieh y col., 2016), recientemente se ha aceptado que a bajas dosis ambas formas de vitamina son nutricionalmente equivalentes (Rizzoli, 2013), y que las altas dosis deben evitarse por motivos de posible toxicidad y/o ineficiencia debido a la posibilidad de producirse bioacumulación en los tejidos al ser vitaminas liposolubles y ante el riesgo de provocar hipercalcemia que puede desencadenar problemas renales como la formación de cálculos de calcio (Bataille y col., 1991).

Si bien para desencadenar estos problemas es necesario superar cien veces de forma reiterada la dosis diaria recomendada, el consumo de suplementos de vitamina D sin supervisión puede llegar a desencadenar estos problemas. Debido a la normativa de alimentación sobre alimentos fortificados con vitamina D y otros alimentos funcionales, la dosis pese a ser más elevada que en el alimento sin enriquecer se encuentra dentro de un rango seguro para el consumo habitual (Ross, 2011).

Pese a que el ser humano es capaz de sintetizar su propia vitamina D al exponerse a la luz solar existen ciertos factores limitadores que pueden provocar la aparición de un déficit de esta vitamina. La llegada del invierno en regiones de alta latitud disminuye considerablemente el número de horas de luz solar diarias y las bajas temperaturas dificultan aun más la exposición, lo que ha llevado a países nórdicos como Finlandia a incluir sesiones de exposición a lámparas ultravioleta o de "luz solar" así como la comercialización de abundantes suplementos vitamínicos para prevenir este déficit. Otra situación de riesgo de déficit puede producirse durante hospitalizaciones prolongadas como en pacientes inmunocomprometidos.

Mediante prueba clínica de la medida de concentración de 25-hidroxivitamina D en suero se determina si un paciente presenta deficiencia de vitamina D. Valores inferiores a 12 ng/ml indican un déficit severo con riesgo de desarrollar raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. Valores entre 12 y 20 ng/ml se considera un déficit leve de bajo riesgo para individuos sanos y por encima de 20 se encuentran los valores deseables. Con valores superiores a 50 ng/ml pueden empezar a manifestarse síntomas de hipervitaminosis D considerándose medidas superiores a 60 ng/ml de elevado riesgo de manifestación de dichos síntomas. ($0,4\text{ng/ml} = 1\text{ nmol/L}$) (Ross, 2011)

La dosis diaria recomendada (DDR) ha sido recientemente corregida aumentando de 600UI a 800 UI o de 15 a 20 µg diarios de vitamina D ([Pludowski y col., 2016](#)) debido a la aparición de numerosos estudios resaltando nuevas implicaciones de la vitamina D y sus derivados en el metabolismo y la aparición de problemas de salud adicionales al producirse un déficit. Tradicionalmente la vitamina D ha sido considerada la principal defensa ante la osteoporosis y el raquitismo aunque también se han encontrado una fuerte relación con la síntesis de PTH (hormona paratiroidea) y la absorción intestinal del calcio ([Maeda y col., 2014](#)).

Es esperable que la dosis diaria recomendada se siga incrementando a medida que se confirmen nuevas funciones metabólicas y nuevas implicaciones ([Heaney y col., 2013](#)) en que la vitamina D de la dieta contribuye mas a los niveles de lo que se consideraba previamente, o en la que puede haber una ingesta no registrada de fuentes de vitamina D en la dieta ([Cashman y col., 2014](#)).

1.5.3.4 Fuentes alimentarias de Vitamina D

La vitamina D3 puede obtenerse, en cantidades limitadas, a partir de determinados alimentos de origen animal, tales como mantequillas, margarinas, leche y productos lácteos, hígado, carnes y huevos. Sin embargo, el aceite de pescado (caballa, sardinas, salmón y trucha) y de hígado de pescado (bacalao principalmente) contiene concentraciones mucho más altas de Vitamina D, pero son de consumo restringido debido al riesgo de hipercalcemia (ver Tabla-I.12).

En USA está permitida la adición de vitamina D a la leche, y desde el año 2003, la Food and Drugs Administration (FDA) permite la adición de Vitamina D a zumos enriquecidos en calcio ([Biancuzzo, 2003](#)). En 2004 se ha ampliado el permiso a otros alimentos fortificados así como a dietas y suplementos ([Moore y col., 2004](#)). En España, al igual que varios países europeos, la adición de vitaminas en alimentos y, también en la leche, se regula mediante el cumplimiento de legislación de carácter europeo, en particular el Reglamento 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras determinadas sustancias a los alimentos.

Tabla- I.12. Principales fuentes alimentarias de vitamina D.

Alimento	Vitamina D en µg/100g	Vitamina D en UI/100g
Leche de vaca	0,0075-0,001	0,3-0,4
Leche/formulas infantiles reforzadas	1	40
Mantequilla	0,875	35
Margarina reforzada	30	1200
Yogur	2,225	89
Queso	0,3-1,1	12-44
Hígado	0,375-1,25	15-50
Yema de huevo	2-2,5	80-100
Setas	0,175	7
Setas expuestas a luz UV	28,9-31,9	1135-1279
Cereales reforzados	3,325	133
Gambas	3,125	125
Conservas de Atún, sardinas o caballa en aceite	5,6-8,3	224-332
Conservas de salmón	8,625-9	345-360
Salmón/ caballa	9	360
Arenque fresco	40,7	1628
Bacalao fresco	1,1	44
Aceite de hígado de bacalao	40,7	1628
DDR	20	800

(Datos tomados de: Centro de Investigación de Endocrinología y Nutrición Clínica de la Universidad de Valladolid. www.ienva.org)

1.5.3.5 Uso de hongos comestibles como fuente de Vitamina D

El ergosterol es el esteroide predominante en los hongos y puede utilizarse para convertirlo en esteroides y/o en Vitamina D₂. Actualmente, la producción de ergosterol se lleva a cabo mediante fermentación de levaduras, fundamentalmente *S. cerevisiae* (Gao y col., 2003), sin embargo, los hongos y sobre todo los hongos comestibles cultivables, constituyen una fuente actualmente poco utilizada y de un gran potencial, debido a la gran cantidad de producción y a la generación de grandes cantidades de subproductos no-utilizados o infrautilizados.

La deficiencia en vitamina D entre la población mundial está creciendo de manera importante (Millán-Rodríguez, 2015; Cashman y col., 2016). La adquisición de la vitamina D necesaria exclusivamente a través de la vía de la radiación solar es muy complicada y poco realista, además de que la razón riesgo/beneficio de esta vía sigue cuestionándose (Baron y Suggs, 2014). Por lo que el desarrollo, estudio y mejora de vías dietéticas o nutricionales parece una alternativa altamente prometedora y viable; y entre las distintas fuentes que podrían contribuir positivamente destacan los hongos comestibles cultivados industrialmente (Landrier, 2014).

Los hongos comestibles son un buen alimento debido a su sabor e importante contenido en proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y otros compuestos beneficiosos para la salud. Por otra parte, los hongos comestibles son un alimento con una alta aceptación tanto por parte de los vegetarianos como de los no-vegetarianos y pueden ser utilizados para suplementar el aporte de vitamina D en la dieta de las poblaciones con riesgo de deficiencia en esta vitamina. Los hongos comestibles, debido a su contenido en ergosterol, puede suministrar vitamina D₂, y esta forma de vitamina D presenta ciertas ventajas sobre la vitamina D₃ a la hora de absorber la radiación UV de la luz solar. La vitamina D₂ parece ser más efectiva en la remineralización ósea que la vitamina D₃, y menos tóxica (Mehta and Mehta, 2002). Además, la vitamina D₂ no presenta efecto hiper-calcémico (Sato y col., 1991).

Por todo lo dicho anteriormente, lograr obtener champiñones con mayor contenido en sus principales componentes y/o metabolitos beneficiosos para la salud, como el ergosterol, la ergotioneína, el enriquecimiento en selenio o litio, etc., es de un

gran interés por la posibilidades que abre a la obtención directa de alimentos funcionales con el contenido, o muy próximos, a la dosis diaria recomendable.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio del incremento en el contenido en ergosterol, a través de la suplementación en el compost o en la tierra de cobertura.

2.OBJETIVOS

OBJETIVOS

Históricamente los hongos han tenido un papel fuertemente vinculado tanto a la alimentación como a la medicina y con los conocimientos actuales se puede afirmar que ambos campos están fuertemente interconectados. No solo ofrecen un aporte nutricional atractivo de buen sabor y textura, sino que además son candidatos ideales para responder a la demanda creciente de vitamina D.

El mercado de los hongos comestibles continúa en crecimiento y en constante modernización lo que estimula la búsqueda de mejores rendimientos económicos, una calidad superior y el deseo de productos con mayor valor añadido.

Los hongos comestibles enriquecidos en su contenido en vitamina D₂ (ergocalciferol) podrían cumplir con las premisas necesarias para considerarlos un alimento funcional, pero además, el ergosterol por sí mismo, también presenta propiedades beneficiosas para la salud, actuando como cardioprotector, regulador de la respuesta inmune y la inflamación, inhibidor en ciertos tipos de tumores, etc., pudiendo desempeñar un importante papel como nutraceutico. Por lo que el incremento de ambos compuestos refuerzan la idea de aprovechar los hongos comestibles como alimentos funcionales *per se* y/o de sus componentes como nutraceuticos.

Por todo ello el **objetivo fundamental** de este trabajo ha sido:

- i) Estudiar la manera de incrementar el contenido en ergosterol de *Agaricus bisporus* (el champiñón común), sin alterar grandemente el proceso tradicional o clásico, con el fin de incrementar el contenido en vitamina D₂ (por irradiación o tratamiento con luz UVB) en el champiñón, de manera que su contenido en una ración (80-100 g p.h.) pudiera suministrar la dosis diaria de vitamina D₂.
- ii) Desarrollar un nuevo alimento funcional.

Teniendo en cuenta que el ergosterol es un metabolito inducible como respuesta a cambios en el medio de cultivo, la modificación de éste mediante la suplementación con subproductos agroindustriales ricos en nitrógeno proteico y carbono puede no solo cumplir el objetivo propuesto, sino que además puede colaborar a reducir el impacto medioambiental negativo generado por estas industrias.

Por lo que los hitos u objetivos propuestos en este trabajo de Tesis pueden agruparse en cuatro grandes bloques:

1° Enriquecer el contenido de ergosterol en cultivos de *Agaricus bisporus* mediante la adición de subproductos agroindustriales caracterizados en cultivos sumergidos y en placas para evaluar la eficacia de inducción de la ruta metabólica.

2° Corroborar la eficacia de los subproductos que han inducido un incremento de concentración de ergosterol, en los ensayos previos, en el modelo de producción industrial sobre un compost mínimo definido y el compost de producción (industrial).

3° Valorar el proceso de fotoconversión de ergosterol a vitamina D en sus condiciones óptimas y aplicables para obtener un alimento funcional comercializable (con la dosis diaria recomendable de vitamina D).

4° Validar las modificaciones propuestas en el modelo de producción (caracterización de champiñones ricos en vitamina D2) así como comprobar la seguridad de los productos obtenidos (Toxicidad) y su eficiencia (Bioaccesibilidad y Biodisponibilidad).

Resumiendo, en el presente trabajo de tesis doctoral y basándonos en los trabajos previos realizados en el grupo AGR-258 de la US en los últimos años: P06-CTS-01887; IPT-2011-1418-0; RTC-2015-4039-2; H2020-IND-CE-2016/17; PR2009-0505/0270, se ha estudiado:

1. La modificación del medio de cultivo (compost) mediante la suplementación con sub-productos agroindustriales potencialmente inductores de la biosíntesis de ergosterol.
2. El proceso de fotoconversión del ergosterol en vitamina D2, de modo que sea posible obtener un producto con cantidad suficiente de vitamina D2, en una ración, como para cubrir la dosis diaria de vitamina D2 (15 µg), lo que permitiría catalogarlo y comercializarlo como “alimento funcional”.
3. Estudios de toxicidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad con el fin de testar la seguridad alimentaria de dicho producto y sus derivados.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1.REACTIVOS Y EQUIPOS

Los reactivos utilizados han sido todos de calidad analítica. En la Tabla-M&M.1 se muestran los distintos reactivos utilizados y las casas comerciales suministradoras.

Tabla-M&M.1. Reactivos empleados.

Reactivo	Casa comercial
Acrilamida	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Ácido acético	Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Barcelona, España
Ácido Clorhídrico 37% (HCl)	VWR International, Radnor, Pensilvania, USA
Ácido gálico	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Ácido Sulfúrico	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Actina	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Agar Bacteriológico	CONDA, Torrejón de Ardoz, Madrid, España
Agar Dextrosa Patata	VWR International, Radnor, Pensilvania, USA
Alcalasa®	Novozymes, Bagsværd, Copenague, Dinamarca
Aminoacid Standard 20-A	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Anticuerpo β -actina	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Anticuerpo secundario antiratón IgG, HRP linked	Cell Signalling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA
APS Persulfato-amónico 98%	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Beta-glucan assay kit K-YBGL	Megazyme, Bray, Irlanda
Bis-acrilamida	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
CHAPS	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Citrato Sódico	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Colecalciferol (vitamina D3) 99,9%	LGC Ltd, Teddington, UK
Cloruro de Calcio dihidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	VWR International, Radnor, Pensilvania, USA
Cloruro de Cobalto hexahidrato ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Cloruro potásico (KCl)	Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Barcelona, España
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Barcelona, España
DTT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Dextrosa	VWR International, Radnor, Pensilvania, USA
Ergocalciferol (vitamina D2) 99,9%	LGC Ltd, Teddington, UK
Ergosterol (provitamina D2) 96%	LGC Ltd, Teddington, UK
Etanol 96%	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Fenol	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	Scharlab, Sentmenat, Barcelona, España
Fosfato de Sodio dibasico (Na_2HPO_4)	Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Barcelona, España

Glicerol 99%	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Glicina	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Glucosa	VWR International, Radnor, Pensilvania, USA
HEPES	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hexano,99%, grado HPLC	Scharlab, Sentmenat, Barcelona, España
Hidróxido de Sodio 96%	Panreac Quimica SLU, Castellar del Vallès, Barcelona, España
Leche desnatada en polvo	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Medio Dulbecco's Modified Eagle's	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Metanol	Fischer Scientific, Hampton, New Hampshire, USA
Metanol UHPLC-MS	Scharlab, Sentmenat, Barcelona, España
Membrana de PVDF Inmobilon-P	Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, USA
Mercaptoetanol (β -mercaptoetanol)	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Pancreatinina porcina	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Penicilina- estreptomina	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pentobarbital sódico (Exagon 400mg/ml)	Laboratorios Karizoo, Caldes de Montbui, Barcelona, España
Pepsina porcina	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Prestained SDS-PAGE standards, Broad Range	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Propan-2-ol	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Reactivo ECL-2 Western-blotting substrate	Scharlab, Sentmenat, Barcelona, España
Reactivo Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Rojo Ponceau S	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Sales biliares	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
SDS - Sodium Dodecyl Sulphate	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Suero fetal bovino	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sulfato de Hierro heptahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Sulfato de Magnesio heptahidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Sulfato de Manganeseo hidrato ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Sulfato de Zinc heptahidrato ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Sustrato universal Blumenerde (turba negra)	Gramoflor, Vechta, Alemania
TEMED	Applichem, Vilassar del Mar, Barcelona, España
Tiourea	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Tris	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA

Tris-HCl	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Trizma-base	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA
Tween 20	Scharlab, Sentmenat, Barcelona, España
Ultra Ninhydrin Reagent Kit, 2L	Harvard Bioscience, Holliston, Massachusetts, USA
Urea	Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, USA

Los equipos utilizados se muestran en la Tabla-M&M.2 con una descripción breve del equipo, el modelo y el fabricante.

Tabla-M&M.2. Equipos empleados.

Equipo	Modelo	Fabricante
Agitador orbital	PSU-20i	Grant Instruments, Cambridge, UK
Agitador	IKA RW16 basic	IKA, Staufen, Alemania
Analizador automático de hematología	Roche Cobas 6000	Roche, Basilea, Suiza
Analizador de electrolitos	AVL9181	Roche, Basilea, Suiza
Analizador elemental de micromuestras	TruSpec CHNS Micro	LECO Corporation, Michigan, USA
Analizador semiautomático Maccura	Maccura BCS-04	Maccura Biotechnology Co.Ltd., Chengdu, China
Autoclave 75L	Presoclave II	Selecta, Cham, Suiza
Balanza de precisión	TP-1502	Denver instruments, Arvada, Colorado USA
Bioreactor	Biostat A	Sartorius AG, Gotinga, Alemania
Bomba de vacío	GP-110 Gel pump	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cabina de limpieza UV	UVC/T-AR	Biosan, Riga, Letonia
Cámara de cultivo	Fitoclima 18.000 EH	Aralab, Sintra, Lisboa, Portugal
Campana de flujo laminar	Mini-H	Azbil Telstar technologies S.L., Barcelona, España
Cámara frigorífica (estructura)	Cámara modular CME	Vizuete S.L., Sevilla, España
Cámara frigorífica (refrigeración)	Uniblock	Zanotti electronics, Valencia, España
Célula de electroforesis	Mini Protean™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Célula de transferencia	Minitransblot™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Centrifuga (15-50 ml)	Centrifuge 5804-R	Eppendorf , Hamburgo, Alemania
Centrifuga	Avanti J-26XP	Beckman Coulter, Brea, California, USA
Congelador -20°	Comfort nofrost	Liebherr, Kirchdorf, Alemania

Congelador -80°	U410 premium	New Brunswick scientific, Edison, Nueva Jersey, USA
Cromatógrafo analizador de aminoácidos	Biochrom 30+ aminoacid analyzer physiological system.	Harvard Bioscience Company, USA
Cromatógrafo UPLC/GC/TOF	Xevo G2-S Qtof	Waters Cromatografía S.A., Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España
Dispensador	Calibrex 520	Socorex Siba S.A., Ecublens, Suiza
Equipo de agua ultrapura	Nanopure diamond	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Equipo de extracción Soxhlet	SER 148/3	Labolan, Navarra, España
Equipo de refrigeración	Chiller MM7	PolyScience, Niles, Illinois, USA
Equipo de visualización y captura de imagen	Chemidoc™ Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Espectrofotometro	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Estufa con aireación forzada	UF-260	Memmert, Schwabach, Alemania
Frigorífico 4°C	Profi line	Liebherr, Kirchdorf, Alemania
Fuente de alimentación	Powerpack™ basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Germinador	Germinador F-3	Ibercex, A.S.L. Alcalá de Henares, Madrid, España
Homogeneizador	homogeneizador de tejido potter-elvehjem	VWR International, Radnor, Pensilvania, USA
Horno mufla	Termocontroller ST	Nanetti S.R.L., Faenza, Italia
HPLC	HPLC de columna Superdex™	Jasco, Tokio, Japón
Lámpara UV	UVP-LMS-38 EL Series	UVP Analytik Jena LLC, Jena, Alemania
Liofilizador	Cryodos	Azbil Telstar technologies S.L., Barcelona, España
Microcentrifuga	Minispin	Eppendorf, Hamburgo, Alemania

Microscopio	Leica DC-3000	Leica, Wetzlar, Alemania
Molino de corte	Taurus Aromatic	Taurus, Oliana, Lerida
Molino de corte	SM100	Retsch, Haan, Alemania
Panel climatico	Rotronic CO ₂ Display	Rotronic, Basserdorf, Zürich, Suiza
pHmetro	GLP 21	Hach Lange Spain SL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España
Rotavapor	R-200	Büchi, Flawil, Suiza
Tamices	Fischerbrand™	Fischer Scientific, Hampton, New Hampshire, USA Scientific
Vitrina de gases con sistema de seguridad	Flowtronic	Romero Muebles de Laboratorio S.A. , Torrejón de Ardoz, Madrid, España
Voltimetro	Evom	World precision Instruments, Saratosa, Florida, USA
Vortex	Multivortexer V-32	Grant Instruments, Cambridge, UK

3.2. MICROORGANISMO

La cepa empleada en este estudio corresponde a *Agaricus bisporus* Lange Imbatch, suministrada por el Grupo Riberebro. El micelio se suministró crecido sobre granos de trigo. Para el mantenimiento de las cepas en el laboratorio, estas se han crecido en placas de Agar Dextrosa Patata (PDA). La composición de este medio consiste en 4 g/L de peptona de patata, 20 g/L de Dextrosa y 15 g/L de agar bacteriológico, que una vez autoclavado a 121°C durante 20 min se ha distribuido en placas Petri (20 ml de medio/placa).

3.3. SUBPRODUCTOS Y SUPLEMENTOS

Los subproductos utilizados en el presente trabajo son subproductos derivados de la industria aceitera (alperujo (ALP) y hoja de olivo (HO)) y de la industria de conservas de champiñón (tallos y champiñones no comercializables, y líquido de escaldado (LE)) (Tabla M&M.3). Para reducir la variabilidad de composición a lo largo del periodo de experimentación y a la temporalidad de los subproductos procedentes de la industria aceitera, se procedió a acopiar y estabilizar cantidad suficiente de cada subproducto para satisfacer la demanda de los ensayos previstos. Para lo que se procedió a su secado y molienda.

Tabla-M&M.3. Materias primas y/o suplementos utilizados en la suplementación del cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*).

Materia Prima	Suplemento	Procedencia
Alperujo*	Harina de Alperujo (HALP)	Almazara Instituto de la Grasa (Sevilla)
Hoja de olivo*	Harina de Hoja de Olivo (HHO)	Almazara Instituto de la Grasa (Sevilla)
Hoja de olivo*	Extracto de Hoja de Olivo (EHO)	Almazara Instituto de la Grasa (Sevilla)
Tallos de Champiñón**	Harina de Tallos de Champiñón (HTCH)	Grupo Riberebro S.A. (Haro, La Rioja)
Tallos de Champiñón**	Fracción Quitina/Glucanos (F-Q/G)	Grupo Riberebro S.A. (Haro, La Rioja)
Líquido de escaldado**	Líquido de Escaldado concentrado 10 veces (LE-10x)	Grupo Riberebro S.A. (Haro, La Rioja)

*Industria aceitera; **Industria conservas champiñón

El secado de los sustratos se realizó en una estufa Memmert UF-260 (Memmert, Schwabach, Alemania) y la molienda en un molino de corte SM100 Retsch (Retsch, Haan, Alemania) con tamiz incorporado (Figura M&M.1). Para el secado del alperujo y las hojas de olivo las condiciones empleadas fueron 60°C con aireación forzada durante 48 horas o hasta peso constante, removiendo cada 12 horas para evitar la formación de zonas que acumulen humedad y favoreciendo el secado. En el caso de los tallos de champiñón el secado se llevó a cabo a 40°C, para evitar la pérdida de componentes por exsudación.

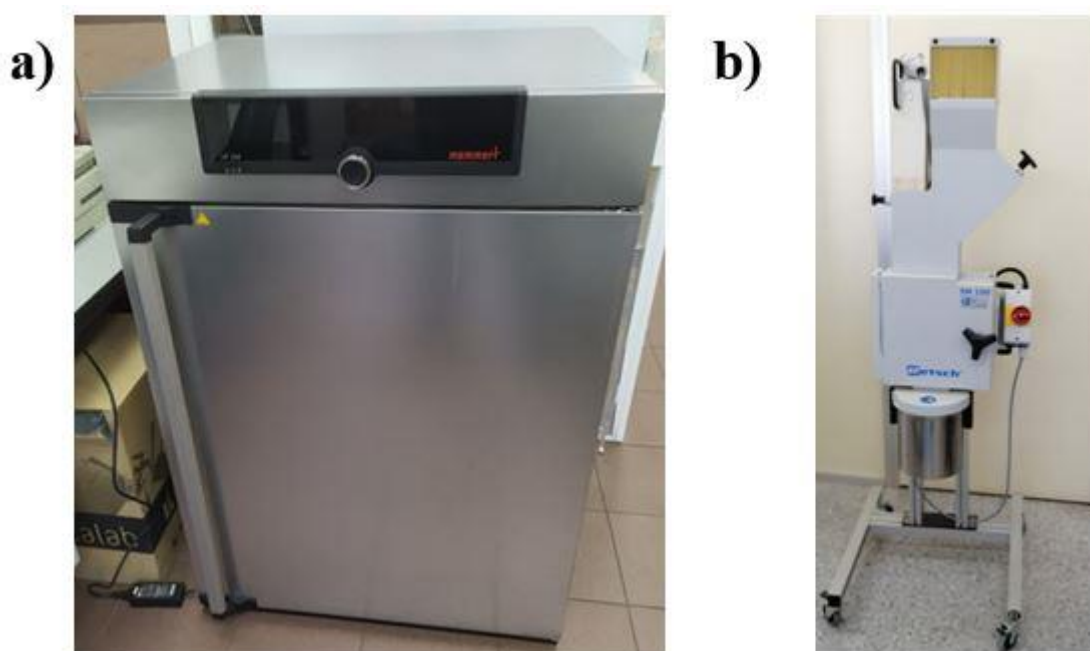


Figura-M&M.1. a) Estufa de secado con aireación forzada Memmert UF-260 y b) Molino de Corte Retsch SM100.

El concentrado de muestras líquidas se ha realizado en un rotavapor R-200 de Büchi (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). La refrigeración del condensador se realizó mediante un equipo de refrigeración "*Chiller*" MM7 (PolyScience, Illinois, USA) (Figura M&M.2).

Los extractos acuosos se evaporan a 40°C con un vacío de 30 - 40 kPa, utilizando una bomba de vacío GP-110 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Los extractos hidroalcohólicos se han concentrado a 30°C y el mismo vacío. Todos los extractos se han concentrado 10 veces, almacenándose a 4°C o congelados a -20°C, hasta su uso.



Figura-M&M.2. Rotavapor R-200 para la concentración de muestras líquidas.

3.3.1. Harina de Alperujo (HALP)

El alperujo es la pasta resultante del prensado de las aceitunas en la producción de aceite de oliva, que se presenta en forma de una pasta acuosa de un color intenso pardo negruzco con trozos de hueso de aceituna. Este subproducto se obtuvo directamente de la almazara del Instituto de la Grasa (Sevilla), congelándose a -80°C hasta el momento de su estabilización. La estabilización, en forma de harina se llevó a cabo mediante la deshidratación y secado a 60°C en una estufa con aireación forzada Memmert UF-260, durante 48 horas. Una vez seca se molió en un molino de corte SM100 Retsch con un tamiz de malla de $500\ \mu\text{m}$ y se almacena en duquesas de 500 ó 1000 g con doble tapa para evitar la rehidratación del producto. El resultado final es un polvo fino y brillante de color pardo negruzco el cual se denominó harina de alperujo (HALP) (ver Figura M&M.3).



Figura M&M.3. Harina de alperujo (HALP) subproducto estabilizado proveniente de la industria del aceite de oliva.

3.3.2. Harina de Hoja de Olivo (HHO)

Las hojas de olivo se obtienen del proceso de separación de las aceitunas en la almazara. Las hojas frescas recibidas en el laboratorio se encontraban aun unidas a las ramas rotas durante la recolección y con abundante humedad. Tras su desbrozamiento, el material recibido se secó en una estufa a 60°C con aireación forzada Memmert UF-260 hasta peso constante. Se deshojaron las ramas eliminando restos de aceitunas y las hojas se trituraron en un molino de corte SM100 Retsch con una malla de 500 μm hasta un polvo fino que se almacenó en botes y sacos a temperatura ambiente protegidos de la luz. El resultado final es un polvo fino de color verde intenso que se pardea con el paso del tiempo y que se denominó harina de hoja de olivo (HHO) (Figura M&M.4).



Figura M&M.4. Harina de Hoja de Olivo (HHO), subproducto estabilizado proveniente de la industria del aceite de oliva.

3.3.3. Extracto de Hoja de Olivo (EHO)

La HHO se sometió a una extracción hidroalcohólica con etanol al 70% resuspendiendo 50 g de HHO por litro. La extracción se realizó a 45°C, con reflujo, y manteniendo una agitación constante de 120 rpm durante 2 horas. Tras una separación sólido/líquido mediante centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos en frío (4°C), el sobrenadante se concentró al vacío mediante un rotavapor (Büchi R-200) a 30°C y un vacío de 30-40 kPa, hasta una décima parte del volumen inicial. El resultado final es un líquido verdoso-negruzco que se denominó extracto de hoja de olivo (EHO) (Figura M&M.5).

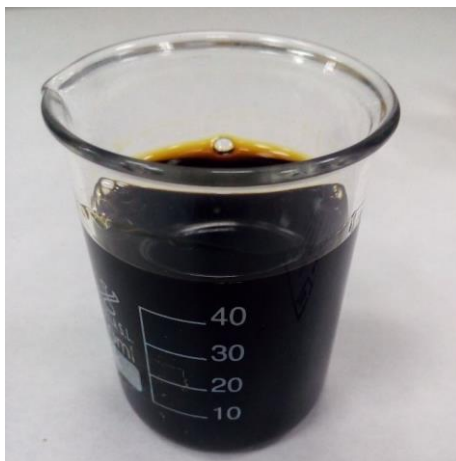


Figura M&M.5. Extracto de hoja de olivo (EHO), de las hojas del olivo.

3.3.4. Harina de Tallo de Champiñón (HTCH)

Los tallos y champiñones desechables, provenientes de la producción del champiñón, una vez recibidos se han lavado con agua fría abundante para eliminar los restos de tierra y compost; y una vez escurridos, se secaron en una estufa con ventilación forzada Memmert UF-260, a 40°C hasta peso constante. Los tallos secos se molieron en un molino de corte SM100 Retsch con una malla de 500 μm . El resultado final es un polvo fino y uniforme de color crema que se denominó harina de tallo de champiñón (HTCH) (Figura M&M.6).



Figura M&M.6. Harina de tallo de champiñón (HTCH), subproducto estabilizado proveniente de la industria del cultivo de hongos comestibles.

3.3.5. Fracción Quitina/Glucanos (F-Q/G)

Al hidrolizar la HTCH con la proteasa Alcalasa® y eliminar la mayor parte del componente proteico, se obtiene una fracción rica en quitina y glucanos (F-Q/G). La hidrólisis se ha llevado a cabo utilizando una concentración de sustrato del 10% (p/v) resuspendido en tampón fosfato 50 mM, pH 8,5, y utilizando una proporción de enzima/sustrato de 0,3 (v/p), manteniendo la mezcla en agitación a 60 rpm, 55°C y pH 8,5 durante 180 minutos, mediante el método del pH-stat (**Adler-Nissen, 1986; Parrado y col., 1993**). La hidrólisis se realizó primero en lotes de 150 gramos manteniendo el pH constante mediante la adición de NaOH 1M de forma manual (Figura-M&M.7a), y de 400 gramos en bioreactor (Bioreactor Biostat A, Sartorius stedim, Gotinga, Alemania) con control automatizado de pH, temperatura y agitación (Figura-M&M.7b).



Figura M&M.7. Hidrolisis enzimática para la obtención de F-Q/G: a) en matraz (manual); b) en bioreactor Biostat A.

Terminada la hidrólisis, el hidrolizado se centrifugó a 10.000 g, descartándose el sobrenadante (hidrolizado proteico) y conservándose el precipitado (F-Q/G_{bruta}). Este precipitado insoluble se aclaró mediante lavados con abundante agua fría hasta que los lavados no presentasen coloración (Figura-M&M.8).



Figura M&M.8. Aspecto de la F-Q/G antes del proceso de secado.

La pasta resultante se secó a 55°C en estufa con aireación forzada Memmert UF-260 hasta peso constante y se molió en un molino de corte SM100 de Retsch con un tamiz de 500 µm, el producto resultante, un polvo fino uniforme, enriquecido en quitina y glucanos, se denominó fracción enriquecida en quitina y glucanos (F-Q/G), y se conservó en frascos sellados, a temperatura ambiente (Figura M&M.9).



Figura M&M.9. F-Q/G, subproducto estabilizado proveniente de la fracción insoluble de la hidrólisis enzimática de la harina de tallo de champiñón, rica en Quitina y Glucanos.

3.3.6. Líquido de escaldado concentrado 10x (LE-10x)

El líquido proveniente del escaldado de champiñones en el proceso de envasado de las conservas, o líquido de escaldado (LE), se recibió de la planta de procesamiento de Riberebro en Autol (Logroño, La Rioja) y se conservó a -20°C hasta su uso. Dado que la concentración de solubles es bastante baja, se hace necesaria su concentración. La concentración se llevó a cabo por lotes (aproximadamente 2 L) en un rotavapor R-200 de Büchi a 70°C con un vacío de 30 a 40 kPa, hasta alcanzar una décima parte del volumen inicial. El líquido acumulado se homogeneizó y se conservó a -80°C hasta su uso. Este concentrado se denominó líquido de escaldado 10x (LE-10x). (Figura M&M.10)



Figura M&M.10. Líquido de Escaldado concentrado 10x (LE-10x). Subproducto concentrado de la industria conservera del champiñón.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUPLEMENTOS

Los análisis de la composición de los suplementos y otras materias, se realizaron básicamente de acuerdo a los métodos establecidos por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C), salvo en algunos casos en que se han utilizados métodos específicos.

3.4.1. Humedad

La humedad se determinó de acuerdo con el método de la A.O.A.C. 2006 (**Método 934.01; Water**) mediante gravimetría. Partiendo de 2 g de muestra se procede al secado en estufa a 105 °C durante 24 horas, la muestra deshidratada se atempera en un desecador y se pesa la muestra seca. El peso obtenido expresado en porcentaje es el peso seco. El cálculo del contenido de humedad se determina mediante la diferencia entre el peso inicial y el final expresado como porcentaje respecto al peso inicial.

3.4.2. Hidratos de carbono totales

La determinación de hidratos de carbono totales se ha llevado a cabo mediante el método colorimétrico de Dubois (**Dubois y col., 1956**). Brevemente, 0,5g de muestra se han tratado con 10 mL de una mezcla agua: fenol: H₂SO₄ concentrado en la proporción 2:1:40. La muestra se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente, aumentando la

temperatura de forma gradual hasta los 95°C, y manteniéndola durante 60 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente y centrifugar a 6000 x g se ha medido la absorbancia del sobrenadante a 490 nm. Para obtener la concentración de azúcares, la medida de absorbancia se interpolado en una recta patrón de glucosa trazada con concentraciones conocidas (10 a 100 mg/L).

Como método alternativo, en algunos casos, la concentración de hidratos de carbono totales se calculó mediante el método establecido por la A.O.A.C 2006 (**Método “by difference” NFNAP; Prox.**), estimándose la concentración de hidratos de carbono totales como la diferencia de porcentaje entre el peso total y la suma de las concentraciones correspondientes a proteína, grasa, ceniza y humedad.

3.4.3. Grasa total

La determinación de la fracción lipídica presente en las muestra se ha llevado a cabo mediante extracción Soxhlet con disolvente orgánico (hexano) y destilación del disolvente, determinando por gravimetría el contenido en residuo graso. El proceso se ha llevado a cabo según el método de la A.O.A.C. 2006 (**Método 920.39; FNNAP; LIPD; FA**)

3.4.4. N-total y Proteína total.

El nitrógeno total (N_t) se determinó de acuerdo con el procedimiento establecido por la A.O.A.C. 2006 (**Método 990.03; NITR; NT**), empleando el método de Dumas. El método de Dumas se caracteriza por la pirolisis completa de una muestra y la medición del contenido en nitrógeno de los gases en combustión mediante conductividad. El análisis se realizó utilizando el analizador elemental Truspec CHNS Micro de LECO Corporation (michigan, USA) del servicio de microanálisis del CITIUS-Celestino Mutis (Figura M&M.11).

La determinación del contenido en proteína total se obtuvo según la metodología propuesta por la **FAO, 2003**, a partir del valor de N_t multiplicándolo por el factor de conversión correspondiente: 4,38 para la HTCH 5,5 para la HALP y HHO, y 6,25 para el LE y LE10x (**Braaksma y Schaap, 1996**).



Figura-M&M.11. Analizador elemental de micromuestras Truspec CHNS Micro de LECO.

3.4.5. Composición aminoacídica (aminograma)

El análisis de la composición aminoacídica o aminograma se realizó según el método A.O.A.C 2006 (**982.30E; NFNAP; NITR; AA**) utilizando para ello un Analizador de Aminoácidos Biochrom 30+ (Harvard Bioscience Company, USA) del servicio de Microanálisis del CITIUS-Celestino Mutis. (Figura M&M.12) cuyo funcionamiento está basado en el uso del método clásico de análisis de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna con ninhidrina y determinación colorimétrica a dos longitudes de onda 570 nm y 440 nm (Pro) (**Moore y col., 1958**). La separación de los aminoácidos se lleva a cabo mediante el uso controlado de una rampa o gradiente de tampones de concentraciones y pHs variables.

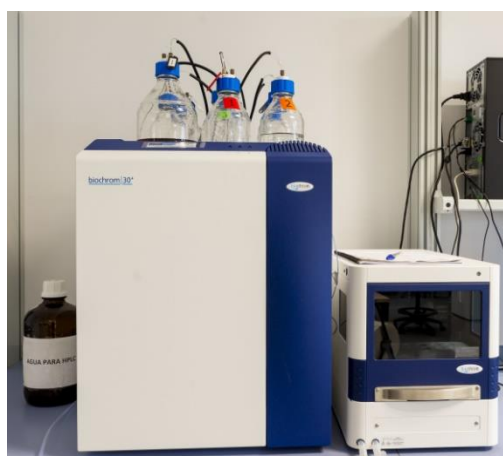


Figura M&M.12. Analizador de Aminoácidos Biochrom 30+, Servicio de Microanálisis CITIUS.

La separación tiene lugar en una columna de resina de poliestireno sulfonado. Inicialmente el pH de la fase móvil es bajo, por lo que los aminoácidos cargados positivamente se verán atraídos por los grupos sulfurosos (SO_3^-). Conforme se va aumentando el pH del tampón los aminoácidos se eluyen diferencialmente al disminuir su carga positiva y ser menos atraídos por el anión. A pH 3.5 los aminoácidos con un grupo ácido extra (Asp y Glu), de su cadena tendrán muy poca afinidad por la resina y serán los primeros en salir de la columna, mientras que los que tengan un grupo extra ionizable capaz de transportar una carga positiva (e.g. Lys, Arg e His) serán retenidos fuertemente por la resina y se eluirán sólo cuando el pH haya aumentado sustancialmente y se haya reducido su carga neta positiva. Además del pH también hay que considerar la concentración del tampón eluyente, pues influye en la elución de tal modo que cuando la concentración de ion aumenta en el mismo, los aminoácidos se eluyen más rápidamente.

El análisis de aminoácidos se han llevado a cabo: i) sin previa hidrólisis (extractos y LE) y corresponde al análisis de aminoácidos libres, y ii) en muestras sólidas, correspondiente a proteínas.

En el caso de las proteínas, para poder realizar el análisis de aminoácidos es necesario hidrolizar las proteínas a aminoácidos libre. Por lo que la hidrólisis de la muestras es una etapa previa obligatoria. Brevemente, las muestras a analizar se han hidrolizado con HCl 6M a 121°C durante 20 horas, terminada la hidrólisis y filtradas a través de una membrana de 0,45µm, las muestras se han secado en una SpeedVac y conjuntamente con los patrones se han disuelto en el tampón de carga (Loading Buffer) (Sodio/Citrato 0.1 M, pH 2.20) y se han cargado en el equipo. Una vez cargada la muestras, los aminoácidos se han separado de acuerdo con las siguientes condiciones: velocidad de flujo 0,1 mL/min; gradiente de pH: tampón-A (Sodio/Citrato 0.25 M, pH 3,20) durante 5 min, tampón-B (Sodio/Citrato 0,4 M, pH 4,25) durante 10 min, tampón-C (Sodio/Citrato 0.65 M pH 6,45) durante 8 min, tampón-D (Sodio/ Citrato 1.2 M pH 7,9) durante 7 min y tampón E o tampón de regeneración (pH 2,20) durante 10 min.

El contenido en triptófano se ha determinado aparte, tras una hidrólisis alcalina, ya que en medio ácido se degrada completamente. El procedimiento seguido ha sido el descrito por (Aitken y Learmonth, 1996)

En el caso de los aminoácidos libres en soluciones, una vez filtradas las muestras, éstas se han secado en una SpeedVac y conjuntamente con los patrones se han disuelto en el tampón de carga (Loading Buffer), procediéndose de la misma manera que se ha descrito más arriba.

3.4.6. Polifenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó de acuerdo al método de la A.O.A.C. 2015.009 basado en la reacción colorimétrica del reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de antioxidantes (Singleton y col. 1965), siguiendo el procedimiento descrito por (Mau y col., 2002). Este método está basado en la reacción coloreada que tiene lugar entre el reactivo Folin-Ciocalteus y el grupo fenilo de los compuestos fenólicos. Como los residuos de tirosina o triptófano de péptidos o proteínas pueden interferir en el método, las muestras son normalmente pretratadas con TCA o HCl para precipitar las proteínas. Brevemente, 100 µL muestra precipitada se mezclaron con 500 µL de reactivo de Folin- Ciocalteu y una vez bien mezclado se añadieron 1,5 mL de solución Na₂CO₃ al 20% y 7,9 mL de H₂O destilada. Tras agitar se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia a 765nm. El valor obtenido se interpola en una curva patrón de ácido gálico de 0 a 10 mM y los resultados se expresan como mEq de ácido gálico/L.

3.4.7. Cenizas totales.

Determinado por gravimetría mediante según el método de la A.O.A.C. 2006 (32.1.05 ó 14.006; NFNAP; MIN; ASH). 2 g de muestra deshidratada en (según el método 934.01) a 105°C durante 24 horas se calcinaron a 550°C en un horno mufla Termocontroller ST de Nannetti (Nanetti S.R.L., Faenza, Italia) durante 8h (Figura M&M.13). El residuo resultante se atemperó en un desecador hasta temperatura ambiente y se determinó el valor final por gravimetría.



Figura M&M.13. Horno mufla Termocontroller ST de Nannetti.

3.4.8. Monosacáridos, oligosacáridos y polialcoholes.

El análisis de monosacáridos, oligosacáridos y polioles se ha llevado a cabo en el Servicio de Microanálisis del CITIUS-Celestino Mutis. Brevemente, la separación de azúcares (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos) y polialcoholes se realizó mediante el método de A.O.A.C. 2006 (**método 977.20**) basado en la separación por HPLC y detección por el índice de refracción aprovechando la especificidad de los tiempos de retención y refracción característicos de cada uno de los compuestos, y utilizando los correspondientes patrones para su cuantificación.

3.4.9. Polisacáridos Fácilmente Hidrolizables (PSFH)

El aislamiento y la cuantificación de la fracción correspondiente a los polisacáridos de *Agaricus bisporus* fácilmente hidrolizables (solubles en agua) (PSFH) se llevó a cabo según el protocolo descrito por (**Jeurink y col., 2008**). Brevemente, 5 g de muestra liofilizada se resuspendieron en 100 mL de agua Milli Q y se autoclavaron a 121°C durante 20 min, una vez enfriados a 4°C, se precipitaron los polisacáridos añadiendo 2 volúmenes de etanol del 96% frío y se dejó precipitar a 4°C overnight. Los polisacáridos precipitados se recuperaron por centrifugación de la disolución anterior a 4.000 rpm durante 60 min a 4°C, decantándose el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 mL de agua Milli Q, sometiéndose de nuevo al procedimiento de extracción descrito, 2 veces más. Seguidamente el los polisacáridos disueltos, en el menor volumen posible, se dializaron durante 24h utilizando una membrana de diálisis

(3500 Da) frente a agua Milli Q. Tras la diálisis se liofilizó el contenido de la membrana y se conservó a -20°C hasta su utilización.

La determinación del contenido total de carbohidratos en los liofilizados obtenidos se ha llevado a cabo mediante una modificación del método del fenol-ácido sulfúrico (**Dubois y col., 1956**) realizada por (**Fox y Robyt, 1991**). Brevemente, 250 µL de una disolución de 1 mg/mL en agua del liofilizado obtenido en el paso anterior, se mezclan con 250 µL de fenol al 5% (p/v). Esta mezcla se agita y se coloca sobre hielo, añadiendo 1,5 mL de H₂SO₄, se calienta a 80°C durante 30 min se enfria temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 490 nm. La concentración se ha calculado por interpolación sobre una curva patrón de glucosa realizada en las mismas condiciones, expresando los resultados como mg/100 g, p.s. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Nota: Las membranas de diálisis se han acondicionado mediante un lavado con agua a 100°C que contiene un 1% de EDTA 0,5 M durante 10 min, seguido de un enfriamiento mediante una inmersión en agua Milli Q.

3.4.10. Polisacáridos Dificilmente Hidrolizables (PSDH)

El contenido en polisacáridos difícilmente hidrolizables (PSDH) se ha determinado utilizando la fracción insoluble obtenida en el paso anterior. Los PSDH básicamente se corresponde con la “fibra cruda” por lo que se han determinado mediante el método de la AOAC 2006 (Método Ba 6a-05) basado en la digestión con H₂SO₄ 0,127M y NaOH 0,313M y determinación gravimétrica del material no hidrolizado, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PSDH} = [(g \text{ M}_i - g \text{ M}_f)/100]$$

Donde M_i se corresponde con los gramos de muestra iniciales y M_f con los gramos de muestra finales.

3.4.11. Glucanos

La determinación del contenido en α y β -glucanos se realizó de acuerdo al método de A.O.A.C **995.16** basado en la degradación enzimática de las muestras y la determinación del contenido por gravimetría. Para su realización se utilizó un kit comercial de la casa Megazyme (Cat. No. K-YBGL) que permite el análisis de 1,3:1,6- β -glucanos y α -glucanos en muestras de hongos y levaduras, siguiendo el procedimiento descrito por (McCleary y Draga, 2016).

- Medida de α -glucanos (almidón/glucógeno)

En tubos Falcon de 25 mL se pesan muestras de unos 100 mg (peso exacto) y se añade a cada tubo 2 mL de KOH 2M frío (4°C), se cierran bien los tubos y se ponen a agitar en una noria, a 60 rpm, durante 30 min, en cámara fría (4°C) para disolver los α -glucanos. a un tubo falcon de 15 mL. Seguidamente, a cada tubo, se han añadido 8 mL de tampón acetato 1,2 M, pH 3,8 y se han agitado bien en un vortex, 0,2 mL de una mezcla enzimática compuesta por amiloglucosidasa (1630 U/mL) más invertasa (500 U/mL), se han agitado e incubado a 40°C durante 30 min. Terminada la digestión, los tubos se han centrifugado a 6.000 x g y en el sobrenadante se ha determinado la concentración de glucosa mediante el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa, de acuerdo con el fabricante del Kit. Brevemente, 0,1 mL del sobrenadante se mezclan con 3 mL del reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa, se incuba a 40°C durante 20 min, y se mide la absorbancia a 510 nm frente a un blanco reactivo (0,1 mL tampón acetato 200 mM, pH 5 más 3 mL reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa). Para cuantificar, 0,1 mL de una solución estándar de glucosa (1 mg/mL) se tratan con 3 mL del reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa, se incuba a 40°C durante 20 min, y se mide la absorbancia a 510 nm frente a un blanco reactivo. El contenido en glucosa se determina mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{D-Glucosa}] (\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A_{\text{Muestra}}) / (\Delta A_{\text{Estándar}})] 1000$$

- Medida de glucanos totales

Los glucanos totales se han determinado previa hidrólisis con ácido sulfúrico. Brevemente, en tubos de vidrio de 25 mL, con rosca, se pesan muestras de unos 100 mg

(peso exacto), y sumergidos los tubos en un baño de hielo, se añade a cada tubo 2 mL de H₂SO₄ 12M frío (4°C), se cierran bien los tubos y se agitan, con cuidado, en un vortex, se introducen en el baño de hielo y se incuban durante 3 h, agitando periódicamente los tubos, cada 10 min, p.ej. Terminada la digestión, se añadieron 12 mL de H₂O a cada tubo, se cerraron y agitaron vigorosamente en el vortex, se aflojaron las tapas y se introdujeron en un baño de agua a 100°C. Pasados 5 min se cerraron bien las tapas y se incubaron a 100°C durante 2 h, en campana de seguridad. Terminada la incubación los tubos se enfriaron a temperatura ambiente, se abrieron cuidadosamente, y se añadieron 6 mL de KOH 1M y se mezclaron en un vortex. El contenido de cada tubo se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL y se enrasó a dicho volumen con tampón acetato 200 mM, pH 5. Una vez bien agitado, se tomó una muestra de 5 mL y se centrifugó a 6.000 xg durante 10 min y se determinó el contenido de glucosa mediante el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa, de acuerdo con el fabricante del Kit, tal y como se ha descrito más arriba.

El contenido en β-glucanos se determina a partir de la siguiente fórmula:

$$[\beta\text{-glucanos}] = [\text{Glucanos totales}] - [\alpha\text{-glucanos}]$$

3.4.12. Quitina

El contenido en quitina se ha determinado mediante un método colorimétrico de glucosamina previa hidrólisis ácida de las muestras, de acuerdo con el procedimiento descrito por (Katano y col., 2016) con ligeras modificaciones. Brevemente, 100 mg de muestra desproteinizada se han mezclado con 100 mL de HCl 5 M, y la mezcla se ha mantenido a 100°C con reflujo durante 12 h. En estas condiciones la quitina se despolimeriza y se desacetiliza completamente a glucosamina (GlcN). 200 µL del hidrolizado se neutralizan con 200 µL de NaOH 5 M y se mezclan con 2 mL de una solución (Na₂SiO₃ 50 mM, Na₂MoO₄ 600 mM, CH₃COOH 1,5 M, dimetil sulfóxido 30%). La mezcla se mantiene a 70°C durante 30 min, de esta manera la GlcN reduce el Mo(VI) formando un anión molibdosilicato azul que presenta un máximo de absorción a 750 nm. La concentración de quitina se ha determinado por interpolación sobre una curva patrón trazada con GlcN, y los resultados se han expresados como mg de GlcN/g de muestra.

Nota: la desproteinización de las muestras se ha llevado a cabo con NaOH 1 M a 100°C durante 2 h. Una vez terminada la desproteinización y enfriado se ha centrifugado a 6000 x g durante 10 min, y se ha eliminado el sobrenadante. El precipitado se ha resuspendido en agua y se ha neutralizado con HCl 1M. Se ha centrifugado y eliminado el sobrenadante, el precipitado se ha secado en estufa y constituye la muestra a analizar (muestra desproteinizada).

3.5.MEDIOS DE CULTIVO PARA CRECER *A. BISPORUS*

3.5.1. Medio Líquido mínimo definido: MLmd

La composición del Medio líquido mínimo definido (MLmd) para el crecimiento de hongos se muestra en la tabla M&M.4. El procedimiento incluye la preparación de 3 soluciones stock concentradas (A, B y C) preparadas en agua destilada, que pueden conservarse en frío tras ser autoclavadas a 121°C durante 20 minutos.

El medio mínimo es suplementado en cada ensayo con el sustrato inductor previamente estabilizado (ver suplementos) en la proporción peso/volumen correspondiente. Los medios de cultivo se enrasan con agua de grifo y se llevan a un pH de 5,5 y son autoclavados a 121°C, 20 minutos.

Tabla M&M.4. Composición del Medio líquido mínimo definido

Composición MLmd			Reactivo	Solución Stock (1L)	Concentración en el medio
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L	Solución A (50x)	FeSO ₄ 7·H ₂ O	250 mg/L	5 mg/L
Dextrosa	0,5 g/L		MnSO ₄ H ₂ O	80 mg/L	1,6 mg/L
Urea	0,45 g/L		ZnSO ₄ 7·H ₂ O	70 mg/L	1,4 mg/L
Solución A (50x)	20 ml		CoCl ₂ 6·H ₂ O	100 mg/L	2 mg/L
Solución B (1M)	2,4 ml	Solución B (1M)	MgSO ₄ 7·H ₂ O	246 g	2,4 ml/L
Solución C (1M)	4,1 ml	Solución C (1M)	CaCl ₂ 2·H ₂ O	147 g	4,1 ml/L

3.5.2. Medio Sólido mínimo definido agar: MSmd-agar

El medio Sólido mínimo definido consiste en una versión gelificada del MLmd al que se ha añadido agar bacteriológico al 1,5%. Los medios autoclavados son distribuidos en placas de Petri de 9 cm de diámetro vertiendo 20 ml de medio bien mezclado, con la ayuda de un dispensador de medios Calibrex 520 de Socorex Siba S.A. (Ecublens, Suiza). Las placas se dejan enfriar en ambiente estéril (campana de flujo laminar Mini-H, Azbil Telstar technologies S.L., Barcelona, España) para evitar la formación de condensados y se conservan a 4°C en bolsas estériles selladas hasta su uso.

3.5.3. Preparación de compost

3.5.3.1. Compostaje

El compostaje de la biomasa destinada al cultivo de champiñón no es exactamente igual en todos los países, si bien los pasos básicos son los mismos. En España según (**García-Rollán, 2007**) la formulación básica del compost para champiñón consta de: paja (56,3%, p/p), estiércol de caballería (28,1%, p/p), gallinaza (14,1%, p/p), urea (1,1%, p/p) y sulfato amónico (0,4%, p/p), con la posterior adición de yeso durante la maduración del compost.

El principal objetivo del compostaje consiste en favorecer que el sustrato agote los carbohidratos solubles que puedan favorecer la proliferación de organismos competidores quedando solo nutrientes aprovechables por el champiñón y los microorganismos que lo benefician. Estos microorganismos colaboran en la eliminación del amoníaco y la regulación del pH y posibilitan el cambio de la estructura de la biomasa hacia una estructura más porosa que favorece el intercambio de gases y el drenaje del exceso de agua.

El proceso se inicia humedeciendo la paja durante 2 a 5 días y añadiendo el resto de materias primas (estiércol, gallinaza, urea y sulfato amónico.) Esta mezcla que presenta una razón C/N de 23 a 30, debe seguir humedeciéndose entre 8 y 17 días más con volteos periódicos. Puesto que la mezcla aun contiene hasta un 0,5% de amonio algunos países han legislado que esta etapa debe realizarse en espacios controlados que limiten las emisiones. La fermentación del compost hasta su madurez se realiza en

cordones que se fumigan con insecticida. Entre el tercer y cuarto día se añade entre 20 y 25 kg de yeso por tonelada y se voltea la pila. Pasados 3 días la temperatura en el interior de la pila puede llegar a los 80°C debido a la actividad biológica y precisa de un nuevo volteo que se repite 2 días después. Llegado a este punto el compost ha madurado alcanzando las condiciones adecuadas para el cultivo de champiñón y es pasteurizado durante 16 horas a 60°C y un 95% de humedad. El enfriamiento del compost se realiza a lo largo de 6 días evitando que la temperatura baje más de 2,5°C/día, favoreciendo la reaparición de los organismos termófilos. Como alternativa es posible la esterilización a temperatura elevada 100-121°C siempre que después se reintroduzca en el compost un inoculo con organismos termófilos como los que se desarrollarían de forma natural en las condiciones de pasteurización. Finalmente el compost se deja enfriar hasta los 25-30 grados, temperatura apropiada para la siembra del champiñón.

El aspecto final del compost apto para el cultivo de champiñón presenta una coloración parda o chocolateada con fragmentos de paja parcialmente degradada. Al tacto presenta consistencia homogénea blanda, elástica y húmeda, (similar a una arcilla suave poco maleable). No debe presentar olor a amoníaco u otros olores desagradables. La composición final suele presentar pH neutro con una humedad próxima al 70%, el contenido de materia orgánica supone entre un 70 y un 78% del peso seco con un contenido en nitrógeno del 2 al 2,6%. La razón C/N suele estar entre 16 y 19 aunque es preferible conseguir valores próximos a 12 en los que se aprecia una mayor productividad ([García-Rollán, 2007](#)).

3.5.3.2. Compost mínimo

Para estudiar el efecto de distintos compuestos sobre el contenido de metabolitos de interés (ergosterol en nuestro caso) se elige un compost con los nutrientes necesarios para que el micelio se desarrolle y formen los cuerpos fructíferos sin optimización de la productividad. En nuestro caso el compost mínimo ha presentado la siguiente composición: paja de trigo 10 Kg, mix-enzimático (Cultivo estabilizado de microorganismos de gallinacea y estiércol de caballo crecidos en Dextrosa Broth) 1,50 L, perlita 1,5 Kg, urea: 0,20 Kg, SO₄Ca 5H₂O 0,2 Kg, agua.

3.5.3.3. Compost de producción

A diferencia del compost de ensayo el compost empleado en industria suele llevar suplementos nutricionales ricos en N biodisponible que favorecen una mayor producción de biomasa por lote de compost.

3.5.3.4. Tierra de cobertura

Para la tierra de cobertura necesaria durante el periodo de fructificación, se empleó el sustrato universal Gramoflor, una turba negra comercial con la siguiente composición y características: materia orgánica: 90% (turba de *sphagnum* y fibra de madera), pH: 5,4-6,2, humedad ~ 40%, granulometría: 0-20mm. La tierra de cobertura empleada se esterilizó previamente a 121°C durante 1 hora en autoclave para reducir el riesgo de contaminación.

3.6. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.6.1. Crecimiento en MLmd y MSmd-agar

Para evaluar la variación de composición y el impacto sobre la producción resultaba necesario establecer una referencia de partida en la que *A. bisporus* fuese capaz de desarrollar biomasa suficiente para su análisis experimental sin tener exceso de nutrientes accesibles que pudiesen enmascarar el efecto de los suplementos.

3.6.1.1. Medio Líquido mínimo definido - MLmd

El medio líquido empleado para el cultivo de *A. bisporus* es un medio de crecimiento mínimo para hongos filamentosos empleado en estudios con *Trichoderma* sp. Tras comprobar que *A. bisporus* también era capaz de crecer en el medio y presentar diferencias en la producción de biomasa al añadir sustratos adicionales (HTCH, HHO, Salvado de Arroz, HALP, etc) se optó por su empleo como base de medio mínimo.

La composición de MLmd contiene en peso/volumen 4% harina de patata, 0,45% Urea cristal, 0,15% KH_2PO_4 , 0,24% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,41% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y un 2% de una solución Stock de metales con la siguiente composición: 5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ver tabla M&M.4.).

Tomando como punto de partida MLmd se añadieron proporciones de 0,5%, 1% y 2% de cada uno de los sustratos a evaluar y se ajustó el pH a 5,5. Los medios se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos y se dejaron enfriar hasta la inoculación.



Figura M&M. 14. Medios MLmD suplementados (nombrados como Medio Liquido mínimo de Hongos) con biomasa de *A. bisporus* apreciable tras dejar reposar el medio unos minutos.

Los cultivos se mantuvieron en agitación suave durante 7 días a temperatura ambiente (21°) en agitador orbital PSU-20i de Grant Instruments, (Cambridge, UK) (Figura M&M.14). Los cultivos finalizados se centrifugaron a 10.000 g para la recuperación de biomasa y se liofilizaron para su posterior análisis. La evaluación de biomasa se realizó por gravimetría tomando como referencia el liofilizado de medios estériles no inoculados.

3.6.1.2. Medio Sólido mínimo definido en Agar - MSmd- agar

El comportamiento de los hongos filamentosos en medio líquido y en medios sólidos como el compost puede presentar diferencias debido a la heterogeneidad del medio sólido o, a diferencias en la disponibilidad de oxígeno. Para obtener una evaluación del impacto en medio sólido homogéneo se optó por la gelificación de MLmd y MLmd suplementados. La gelificación se realizó al 1,5% con Agar bacteriológico, la misma proporción presente en el Agar Dextrosa Patata empleado en el mantenimiento de las cepas.

Para cada suplemento se prepararon 200 ml de medio MLmd adicionado con 0,5% del suplemento correspondiente distribuyendo 20 ml de medio en placas petri con un dispensador Calibrex 520 de Socorex.

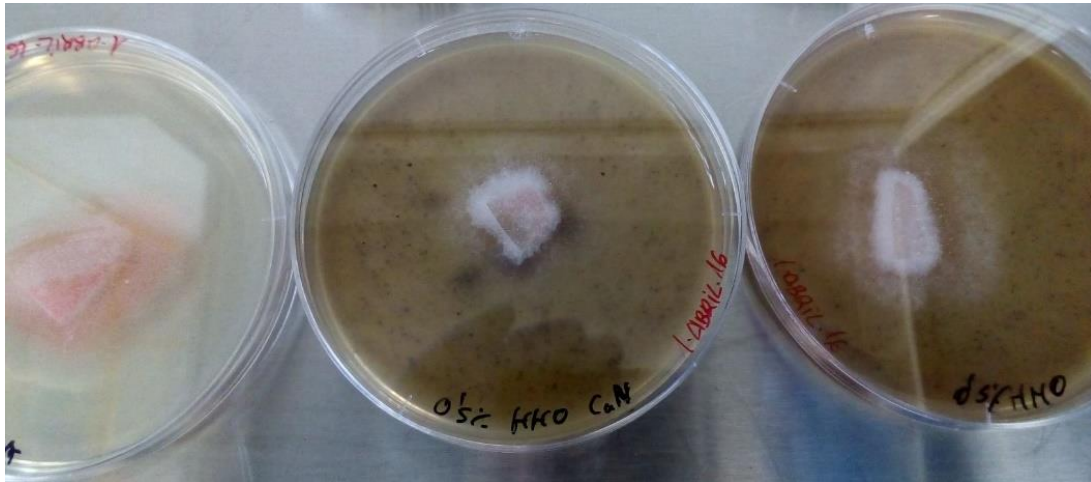


Figura M&M.15. Placas de MSmd-agar suplementado. Se muestra como ejemplo placas suplementada con HHO 0,5% respecto a una placa referencia de PDA.

Las placas se crecieron en el germinador F-3 (Ibercex, A.S.L. Alcalá de Henares, Madrid, España) del servicio de invernadero a 28°C durante 7 días en condiciones de oscuridad absoluta (Figura M&M.15).

La evaluación del crecimiento se determinó por gravimetría, a partir del peso seco de las placas, tras su secado a 60°C, hasta alcanzar peso constante, en una estufa con aireación forzada. Como referencia se tomaron réplicas de placas sin inocular.

3.6.2. Crecimiento en sacas de compost

3.6.2.1. Preparación de micelio: granos de trigo.

Para la obtención de biomasa como inóculo para sacas de compost se utilizan bolsas de granos de trigo o cebada esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La inoculación puede hacerse desde una suspensión de esporas obtenida mediante la recuperación de la esporada o desde biomasa procedente de placas de agar crecidas.



Figura M&M.16. - Granos de trigo inoculados con *A. bisporus*.

Las bolsas se dejan crecer a 25°C para obtener lo que se denomina el “blanco” que se mezclara con el compost para la formación de las sacas (Figura M&M.16). Este proceso de colonización puede durar entre 2 y 3 semanas. Si se realizan agitaciones de las bolsas cada 2 días la colonización será un poco más lenta, pero los granos inoculados son fácilmente disgregables. Si por el contrario no se realiza el proceso de mezcla, el micelio tenderá a formar bloques compactos que pueden llegar a dificultar la mezcla con el compost.

3.6.2.2. Cámara de cultivo

Se emplearon las cámaras de cultivo disponibles en el servicio de invernadero del Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla Celestino Mutis (CITIUS), modelo Cámaras Visitables Fitoclima 18.000 EH (Aralab, Sintra, Lisboa, Portugal) con control de CO₂ que disponen de humidificadores por pulverización, control de luz (bajo condiciones de oscuridad total excepto durante la revisión de los cultivos) y aireación que además fue monitorizado por duplicado mediante un panel climático (Rotronic CO₂ Display, Basserdorf, Zürich, Suiza) ubicado en la zona de crecimiento y concordante con las condiciones marcadas por la cámara en el exterior (Figura M&M.17).



Figura M&M.17. Interior de la cámara de cultivo Fitoclima 18.000 EH de Aralab con panel climático Rotronic CO₂ Display empleado como control interno de las condiciones en la proximidad de los cultivos.

3.6.2.3. Inóculo

El compost básico para el cultivo de hongos debe tener una proporción de C/N próxima a 12. Durante el empaquetamiento del compost para formar las sacas se produce una etapa de mezclado previa junto a la “semilla” crecida en granos de trigo o cebada. En el modelo de producción empleado en España el compost inoculado se compacta y embala en plástico que actúa de protección y reduce la pérdida de humedad durante el crecimiento del micelio.

3.6.2.4. Incubación / Colonización

El compost inoculado se mantiene en condiciones de temperatura, humedad e iluminación estable hasta que superficie está completamente colonizada por el micelio. Las condiciones de esta etapa de colonización del sustrato se caracterizan por temperaturas elevadas (21-24°C), escasa aireación y elevada humedad del sustrato (99%) sin producirse encharcamiento. Estas condiciones simulan las condiciones de

crecimiento del micelio en el mantillo con una gran concentración de nutrientes disponibles para el hongo en crecimiento.

Tradicionalmente se disponía el compost en hileras aunque el modelo actual favorece que el compost se compacte en sacas cubiertas en plástico que facilita la manipulación y colabora a mantener los niveles de humedad y CO₂ en el sustrato, protegiéndolo de posibles contaminaciones ambientales.

La etapa de colonización del compost varía según el tipo de cepa empleado, aunque de forma habitual esta etapa tiene una duración aproximada de 3 semanas (Figura M&M.18).

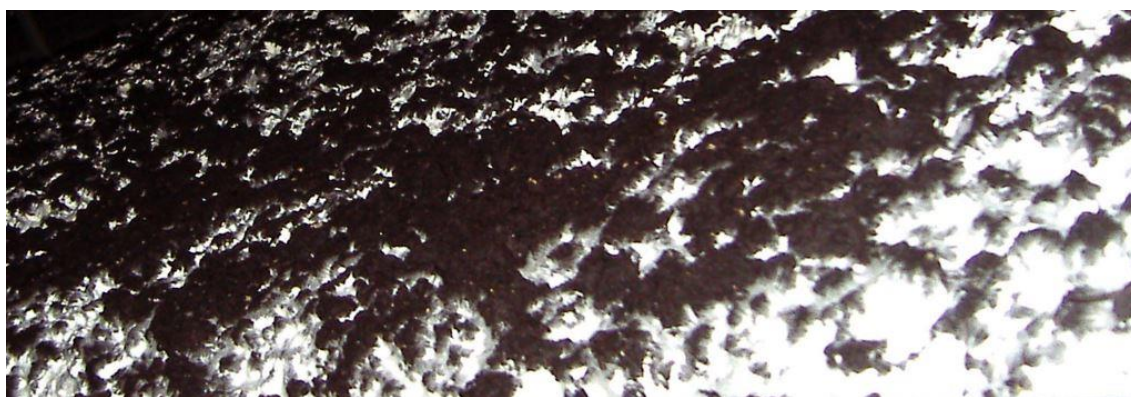


Figura M&M.18. Micelio de *A. bisporus* colonizando compost.

3.6.2.5. Fructificación; tierra de cobertura y condiciones de fructificación.

Las condiciones para la producción de cuerpos fructíferos son radicalmente diferentes de las establecidas por el óptimo de crecimiento en la etapa de colonización del compost. Puesto que los hongos requieren condiciones de estrés para inducir la fase de reproducción sexual se suele emplear un conjunto de condiciones que favorece la formación del esporocarpo como suelen ser una disminución de la temperatura ambiental, una aireación más pronunciada que mantenga los niveles de CO₂ por debajo del 1% manteniendo una humedad ambiental elevada.

En el caso de *A. bisporus* las sacas de compost listas para fructificar se exponen retirando la superficie de plástico y añadiendo una capa de tierra de cobertura. Esta tierra de cobertura suele ser turba rubia, turba negra o una mezcla de ambas. La temperatura se reduce hasta alcanzar 18°C lo que supone un choque térmico para el

hongo e induce la producción de las setas. Una humedad ambiental próxima al 100% mediante riego pulverizado evita que la formación del cuerpo fructífero desarrolle defectos como descamación o cuarteamiento de la superficie del hongo evitando siempre que se produzca encharcamiento del sustrato que favorece la aparición de plagas. Si la concentración de CO₂ supera el 1% es posible apreciar que los cuerpos fructíferos desarrollan un pie más alargado y ocasionalmente sombreros más pequeños.



Figura M&M.19. Aspecto de los botones emergiendo entre la tierra de cobertura

En un plazo de una semana deberían ser apreciables los primeros botones y la temperatura debe reducirse hasta los 10°C manteniéndose hasta el final del cultivo (Figura M&M.19).



Figura M&M.20. Aspecto de *A. bisporus* listo para la cosecha.

Cada saca de compost puede producir hasta tres “floraciones” en el plazo de dos a tres semanas con una disminución paulatina en la producción debido al agotamiento del compost. Las setas deben ser recolectadas antes de la apertura del sombrero puesto que la presencia de esporas puede inhibir la formación de nuevos botones reduciendo considerablemente la productividad (Figura M&M.20).

La recolección de los champiñones se realizó arrancando con cuidado el cuerpo fructífero completo o las agrupaciones de las que luego se separaron las setas individuales. El corte del tallo durante la recolección no está recomendada debido a la exposición de nutrientes a los contaminantes ambientales que pueden reducir drásticamente la vida útil del cultivo en las siguientes floraciones.

La retirada de restos de compost y tierra de cobertura se realizó con un cepillo suave. La base del tallo se cortó tal como se realiza en el procedimiento habitual para descartar el micelio adherido a la tierra de cobertura más difícilmente eliminable (Tallos de champiñón) y los champiñones quedaron listos para la etapa de preparación de muestras.

3.7. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras a analizar deben ser recopiladas, catalogadas, tratadas bajo las condiciones establecidas previamente y estabilizadas hasta el análisis. Para minimizar la variabilidad, es preferible que todas las muestras presenten morfologías similares (diámetro, peso fresco y forma). El esquema general de la preparación de muestras se presenta en la Figura M&M.21.

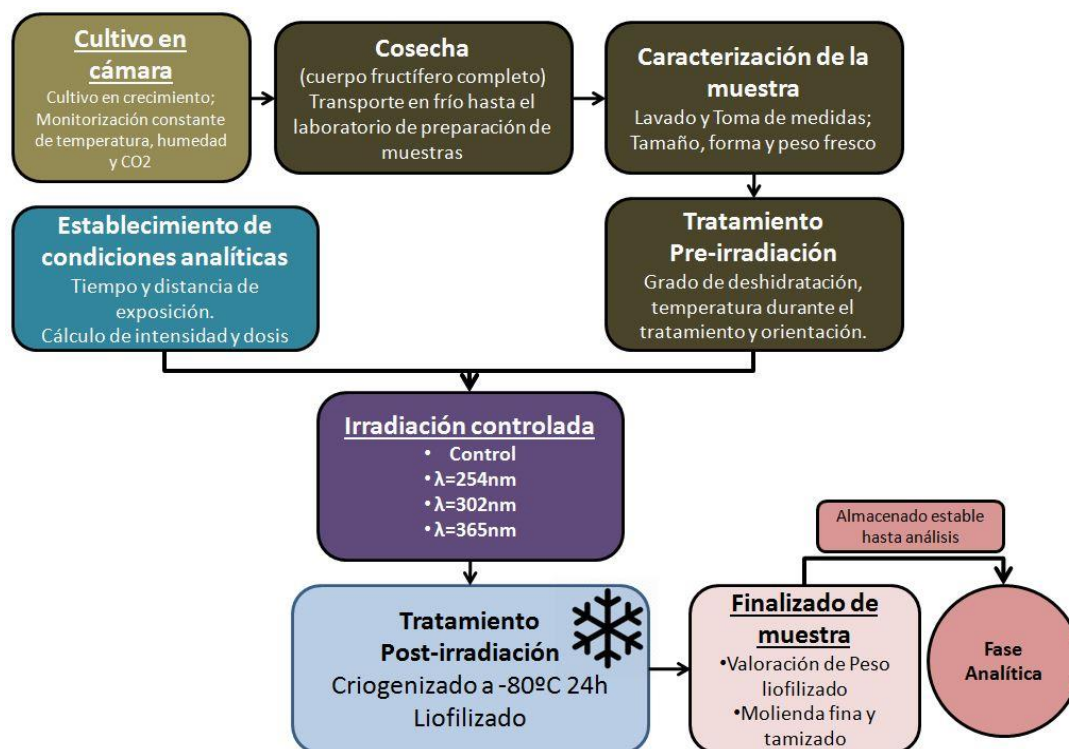


Figura M&M.21. Esquema general del proceso pre analítico desde la recolección de la biomasa hasta la obtención de las muestras preparadas para la valoración de ergosterol y vitamina D.

3.7.1. Cosecha

Dependiendo del tipo de cultivo de partida la recuperación de biomasa para la preparación de las muestras puede requerir de modificaciones adicionales.

Para los cultivos en medio líquido la recuperación de biomasa se realiza mediante una separación sólido/líquido por centrifugación a 8.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante es descartado y el precipitado es recuperado para el análisis (Figura M&M.22).

Para los cultivos en placas de agar se optó por la recuperación completa de la placa mediante deshidratación, por aireación forzada a 60°C hasta peso constante tomando como referencias placas no inoculadas. Suplementos como la HTCH presentan niveles detectables de ergosterol durante la fase analítica por lo que siempre deben emplearse controles negativos para crecimiento como referencias en cada tanda experimental.



Figura M&M.22. Aspecto de la biomasa recuperada de los cultivos MLmd tras la centrifugación.

La biomasa de cultivos en compost se realizó mediante cosecha manual de los cuerpos fructíferos. Cada muestra recolectada es limpiada de restos de compost y tierra de cobertura con un cepillo suave y transportada en frío y oscuridad total hasta el laboratorio. Se toman medidas de su diámetro mayor y menor y se pesan en una balanza de precisión para obtener su peso fresco. Estos datos se incluirán en el etiquetado junto a las condiciones de irradiación y a la tanda de fructificación del compost a la que pertenece.

3.7.2. Tratamiento Ultravioleta

3.7.2.1. Cámara de irradiación ultravioleta.

El diseño de la cámara ultravioleta debe cumplir los siguientes requerimientos: Soportar de forma estable la fuente de irradiación. Tener control sobre la distancia entre la fuente y la plataforma de irradiación. Ofrecer aislamiento entre la fuente de irradiación y el operario teniendo control directo e inmediato sobre el tiempo de exposición. Minimizar la refracción de la luz UV para establecer una dosis precisa de irradiación (Figura M&M.23).

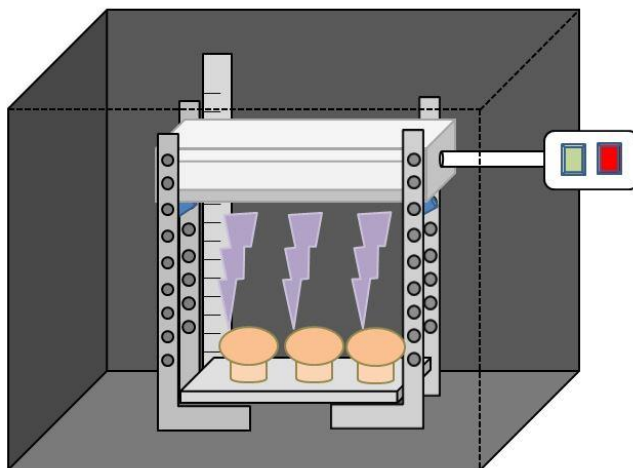


Figura M&M.23. Esquema con los requerimientos mínimos para el diseño de la cámara de irradiación



Figura M&M.24. Prototipo de cámara de irradiación con Lámpara UV modelo UVP-LMS-38 EL Series.

Para la fuente de irradiación UV se optó por el modelo UVP- LMS-38 EL Series (UVP Analytik Jena LLC, Jena, Alemania) con 3 longitudes de onda en el espectro ultravioleta; 365 nm, 302 nm y 254 nm. Las pantallas de protección se utilizó una cabina de limpieza mediante UV de ADN/ARN para PCR modelo UVC/T-AR (Biosan, Riga, Letonia) con protecciones de metacrilato al que se añadió un recubrimiento negro mate para reducir la refracción. Para mayor seguridad y control del tiempo de irradiación el encendido se realizó mediante un interruptor situado en el exterior conectado a la red eléctrica (Figura M&M.24).

3.7.2.2. Condiciones del tratamiento

El tratamiento ultravioleta se realiza inmediatamente postcosecha, tras la caracterización morfológica de los cuerpos fructíferos. La cámara ultravioleta se acondiciona estableciendo la distancia de la fuente a la superficie donde se depositan las muestras y se selecciona la longitud de onda deseada para el tratamiento. Las muestras, si fuese necesario podrían someterse a deshidratación parcial o total, enfriamiento previo según las condiciones experimentales establecidas. Tras el establecimiento de las condiciones las muestras a tratar bajo condiciones idénticas se depositan con la orientación deseada respecto a la fuente de luz UV en una superficie marcada en el soporte (Figura M&M.25). La superficie designada para las muestras coincide con la superficie de exposición de la lámpara UV (22,7 cm x 5,5 cm).



Figura M&M.25. Aspecto del interior de la cámara de irradiación durante el tratamiento UV.

El tiempo de exposición se controla mediante un interruptor situado en el exterior de la cámara y un cronometro para registrar la duración de la exposición. Durante el cambio de orientación la lámpara se desconecta de la corriente se extrae el soporte de las muestras, se procede a la reorientación y recolocación del soporte y se reanuda la exposición. Para los controles sin tratamiento UV se reproduce el procedimiento sin encender la lámpara.

3.7.2.3. Liofilizado

La biomasa fresca se congela a -80°C durante un mínimo de 24 horas para su deshidratación al vacío en un liofilizador Telstar Cryodos (Azbil Telstar technologies S.L., Barcelona, España) durante 48 horas (Figura M&M.26).

La biomasa de cultivos líquidos y de los cuerpos fructíferos es liofilizada en tubos falcón o frascos de tamaño apropiado prepesados para la determinación del peso seco final mediante gravimetría. Durante la deshidratación cada frasco de liofilizado es envuelto en papel de aluminio para reducir la exposición a la luz.



Figura M&M.26. Liofilizador Telstar Cryodos.

El liofilizado es triturado a un polvo fino (molino Taurus aromatic) y tamizado con una malla de $500\ \mu\text{m}$ finalizando el procesado de las muestras que se conservaran protegidas de la luz en ambiente fresco y seco (Figura M&M.27).



Figura M&M.27. Tamices para muestras.

La biomasa procedente de placas de cultivo no precisa de liofilizado al haberse alcanzado la deshidratación mediante aireación forzada a 50°C. Las muestras se trituran a un polvo fino y se tamizan con una malla de 500 µm.

Cada muestra es alicuotada en eppendorf etiquetados con un código de identificación. En una base de datos cada código contiene toda la información recopilada hasta la fase analítica: el tipo de medio de cultivo, inductor y concentración empleada, medidas y peso fresco y seco del cuerpo fructífero recolectado, y condiciones del tratamiento UV como distancia, longitud de onda, temperatura tiempo y orientación.

3.8. EXTRACCIÓN ERGOSTEROL Y VITAMINA D2

Las extracciones se realizaron en el departamento de Química Analítica de la facultad de Química de la universidad de Sevilla. El procedimiento está basado en tres etapas de extracción con solventes orgánicos, una etapa de concentración por evaporación bajo corriente de Nitrógeno y una etapa final de reconstitución de la muestra y el procesamiento necesario para ser medido mediante cromatografía acoplada a espectrómetro de masas (Figura M&M.28).

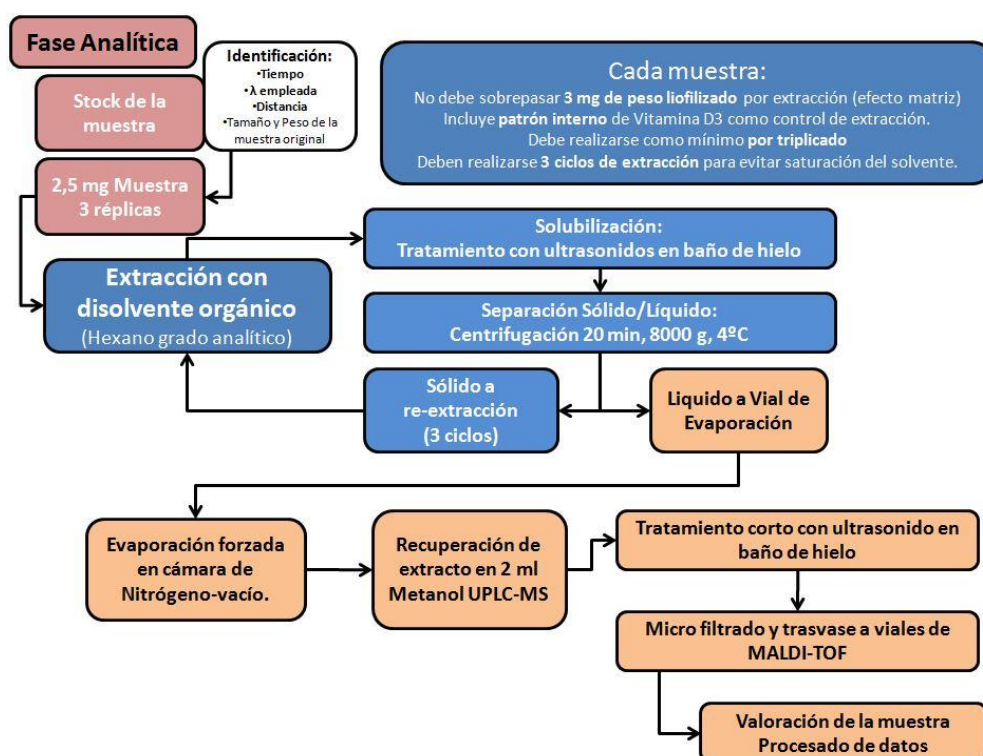


Figura M&M.28. Esquema simplificado de las etapas en la extracción de ergosterol y vitamina D2.

3.8.1. Extracción con solvente orgánico

Para los patrones de referencia empleados tanto en la extracción (controles internos) como referencias analíticas fueron los siguientes: Ergosterol (Provitamina D2) - 96%, Vitamina D2 - 99,9%, Vitamina D3 - 99,9% de Dr. Ehrenstorfer

Para la validación del proceso se realizaron ensayos previos con cantidades crecientes de muestras liofilizadas para evaluar el rendimiento de las extracciones. Empleando soluciones stock de patrones purificados con 10 mg/L de vitamina D3, y concentraciones crecientes de vitamina D2 (2, 5 y 10 mg/L) y Ergosterol (20, 50 y 100 mg/L) se determinó que se apreciaba una disminución significativa del rendimiento al emplear muestras de más de 3 mg de peso liofilizado. Se determinó que esto se debía a un efecto matriz producido por la muestra.

Para las extracciones rutinarias se optó por valores inferiores ofreciendo 2,5 mg rendimientos de recuperación de los patrones internos próximos al 100%. Como patrón interno de recuperación en las extracciones rutinarias se estableció una concentración de vitamina D3 de 10 mg/L.

Para la extracción de cada muestra el protocolo seleccionado determina que:

Cada muestra debe extraerse en tubos de cristal con cierre hermético, debe contener 2,5 mg liofilizados de la biomasa a analizar así como 100 µl de una solución 10 mg/L de Vitamina D3 (colecalfiferol) 99,9% como patrón interno de recuperación.

Cada muestra a analizar debe llevar un mínimo de 3 replicas y cada tanda de extracciones debe incluir un blanco sin muestra con patrón interno de vitamina D3.

Deben realizarse 3 ciclos de extracción añadiendo 6 ml de Hexano de calidad HLPC, solubilizando en un baño de ultrasonidos en frío durante 5 minutos y centrifugando 15 minutos a 8000 g. El sobrenadante se pasa a viales de evaporación y se recarga con otros 6 ml de hexano para reiniciar el ciclo.

La evaporación de hexano se realiza hasta sequedad en una cámara de nitrógeno-vacio dentro de una campana de extracción de gases para mayor seguridad. Cada ciclo de extracción parte de un volumen de 6 ml de hexano, 100 µl de patrón interno de Vitamina D3 hasta un volumen total de extracción de 18,1 ml

3.8.2. Reconstitución de la muestra

Para la reconstitución de los extractos se emplean 2 lavados de 1 ml de Metanol UHPLC-MS 99,9% ayudándose tratamientos cortos con ultrasonido en baño de hielo.

Los extractos reconstituídos deben ser filtrados bajo 0,45 μm de tamaño de poro en filtros de PTFE. La muestra final se guarda a -80°C en viales para HPLC hasta su análisis en el Espectrómetro de Masas QTOF acoplado a UPLC y Cromatografía Gaseosa disponible en el laboratorio de cromatografía del Servicio de Microanálisis.

3.8.3. Análisis HLPC-Masa

Para el análisis se empleó el espectrómetro de masas QTOF acoplado a UPLC y Cromatografía Gaseosa disponible en el laboratorio de cromatografía del Servicio de Microanálisis (Figura M&M.29) (Cromatógrafo UPLC/GC/TOF modelo Xevo G2-S Q-tof de Waters Cromatografía S.A., Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España), en colaboración con los Doctores Rut María Fernández Torres, Mercedes Villar Navarro y Miguel Ángel Bello López.

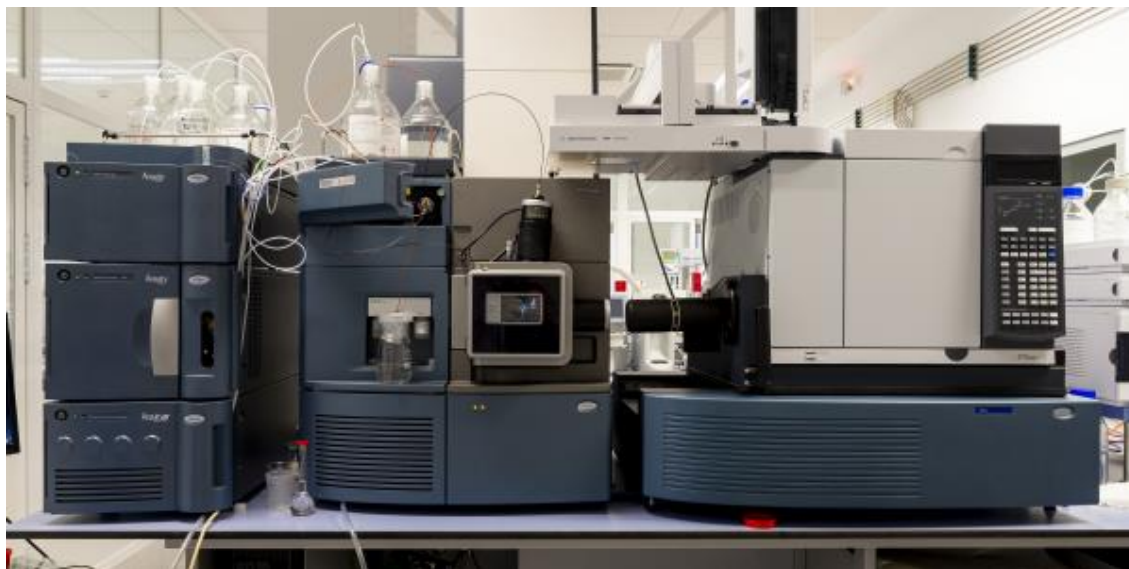


Figura M&M.29. Cromatógrafo UPLC/GC/TOF de Waters modelo Xevo G2-S Q-tof empleado en el análisis de Ergosterol y Vitamina D.

3.9. ENSAYO DE SOBREEXPRESIÓN/INDUCCIÓN DE LA RUTA DE ERG.

3.9.1. Obtención de los anticuerpos.

Para la inmunodetección de las enzimas es necesaria la obtención de anticuerpos específicos para las mismas. Para evitar el complejo proceso de purificación enzimática se ha optado por la obtención de secuencias altamente inmunogénicas basadas en el extremo C-terminal mediante un modelado *in silico* a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos de la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (KEGG) (disponibles en www.kegg.jp) sobre modelos con la mejor homología ofrecidos por el programa de modelado molecular de Swiss-model ExPASy (disponible en Swissmodel.expasy.org).

A las secuencias diana de 15 aminoácidos, correspondientes a los extremos C-terminales, de las enzimas mostradas a continuación se les incluyó una cisteína en el extremo N-terminal para su unión a la proteína de alta inmunogenicidad Keyhole Lympet Hemocianin (KLH) a través de un puente disulfuro.

Estos péptidos sintéticos se enviaron a sintetizar a los laboratorios NEOSYSTEM de Lyon, Francia.

- ERG 11 - **C-TLPKAPREVYYRRRK**
- ERG 6 - **C-KNVGFEIEHEEDLAD**
- ERG 2 - **C-VTAREMIGNTLIGKI**
- ERG 4 - **C-RYCEVVKYKFIPGIY**

La proteína KLH incrementa drásticamente la inmunogenicidad de los péptidos, que por sí mismos son poco o no son inmunogénicos. Al inyectarse en conejos (2 para cada péptido) en el animalario de la Universidad de Sevilla (Estabulario de la Facultad de Farmacia) y esperar el periodo de incubación correspondiente de 2 meses, se ha procedido al sangrado de los animales y a la obtención del suero, que tras su precipitación con sulfato amónico al 40% generan una fracción enriquecida en inmunoglobulinas que contienen los anticuerpos contra las secuencias diana elegidas, y que una vez reconstituido en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4, constituye el reactivo para reconocer las correspondientes enzimas.

3.9.2. Preparación del extracto homogeneizado.

A partir del liofilizado correspondiente de cada muestra a analizar; liofilizado de champiñones crecidos en medio mínimo control, MSmd/compost + HTCH y MSmd/compost + HHO, se prepararon muestras en tampón de lisis a una concentración de 2,5 mg proteína/ml (50 µg) cuya composición se muestra en la tabla M&M.5. Dichas muestras se homogeneizaron en un baño de hielo con la ayuda de un homogeneizador de tejido potter-elvehjem y un agitador RW16 basic de IKA (Staufen, Alemania). El lisado se centrifugó a 8000 xg durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante para los análisis para dot-blot y western-blot.

Tabla M&M.5 composición del tampón de lisis

Urea (Bio-Rad)	7 M
Tiourea (Sigma)	2 M
Tris (Roche)	40 mM
CHAPS (Merck)	4%
DTT* (Bio-Rad)	65 mM

*Añadir antes de usar.

3.9.3. Western-blot

Para la evaluación el efecto de los inductores sobre las enzimas clave en la ruta de síntesis del ergosterol se procedió a realizar ensayos de Dot-blot y Western-blot para las enzimas Erg2 (esterol C-8 isomerasa), Erg4 (esterol C-24 reductasa), Erg6 (esterol C-24 metiltransferasa) y Erg11 (lanosterol C-14 demetilasa). Ambas técnicas están basadas en la capacidad inmunogénica de péptidos pequeños específicos de estas proteínas y en la correlación entre quimioluminiscencia y concentración proteica presente en una muestra. La principal diferencia reside en que, mediante la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) en el Western-blot, es posible separar las proteínas exclusivamente por su tamaño y detectar proteínas específicas. En el ensayo por Dot-blot solo permite la detección de proteínas totales.

3.9.3.1. Electroforesis en PAGE-SDS.

La electroforesis PAGE-SDS se realizó según el método de Laemmli (Laemmli, 1970) empleando un equipo de electroforesis compuesto por la célula de electroforesis modelo Mini protean™ y una fuente de alimentación Powerpack™ Basic de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) (Figura M&M.30).

Al controlar la proporción de acrilamida/bisacrilamida es posible controlar el tamaño de poro generado en el gel por la polimerización. Para este ensayo se empleó un porcentaje del 12% de acrilamida en gel, apropiada para la separación de proteínas de tamaño entre 7 kDa y 200 kDa.

Tabla M&M.6. Composición de las soluciones stock y los geles para la electroforesis PAGE-SDS.

<i>Stock - Running buffer 4X</i>	
Tris HCl 1,5M	36 g
H ₂ O _d	150 ml
pH 8,8	--
SDS 0,4 %	8 ml SDS 10%
H ₂ O _d	Enrase a 200 ml

<i>Running gel 12%</i>	
H ₂ O _d	2,82ml
Acrilamida 30%	6 ml
Bis-acrilamida 1%	2,37 ml
<i>Running buffer 4x</i>	3,81 ml
APS (10%)	30 µl
TEMED	30 µl
Volumen final	15 ml

<i>Stock - Solución A</i>	
Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H ₂ O _d	Enrase a 100 ml

<i>Stock - Stacking buffer 4X</i>	
Tris-HCl 0,5M	6,05g
H ₂ O _d	50 ml
pH 6,8	--
0,4% SDS	4 ml SDS 10%
H ₂ O _d	Enrase a 100 ml

<i>Stacking gel (5%)</i>	
Solución A	1,67 ml
Stacking buffer	1 ml
H ₂ O _d	7,33
APS (10%)	40 µl
TEMED	25 µl
Volumen final	10 ml

La composición de los sustratos necesarios para la polimerización del gel se describen en la tabla M&M.6. Para el tampón de carga para las muestras se preparó un Stock concentrado 4 veces. El stock se distribuyó en alícuotas de 1 ml para su uso. Para cada muestra a analizar se añadieron 80 μ l de muestra y 20 μ l de tampón de carga concentrado 4x (Tabla M&M.7). Las muestras se desnaturalizaron en un baño a 100°C durante 5 minutos para su carga en el gel. Como patrón se emplearon los marcadores Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de BioRad. Las condiciones de corrido del gel fueron 25 mA/gel por gel y 150V hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el límite del gel.

Tabla M&M.7. Composición del Stock concentrado para el tampón de carga

Tampón de carga 4X	
0,02M Tris-HCl pH6,8	2 ml de Tris HCl 100 mM
β -mercaptoetanol 20%	2 ml
SDS 4,6%	0,46g
Glicerol 40%	4 ml de glicerol 99%
Azul de bromofenol 0,01%	0,3ml de Azul de Bromofenol 0,5%
H ₂ O _d	Enrase a 10 ml

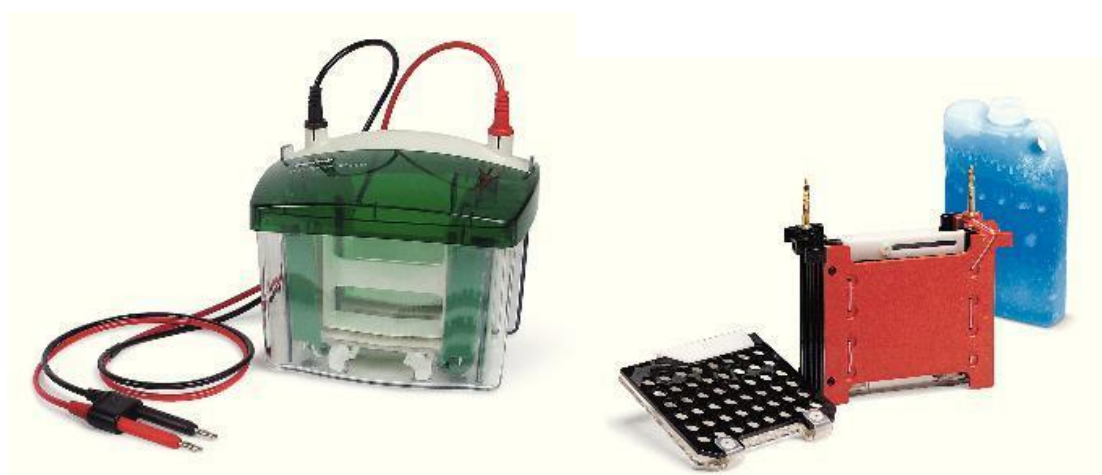


Figura M&M.30. Equipo de electroforesis Mini proteanTM y Mini transblot de Biorad.

3.9.3.2. Transferencia a membrana PVDF

Una vez concluida la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de PVDF de 0,45µm de Bio-Rad. Para ello se empleó un equipo de transferencia Minitransblot de Bio-Rad empleando la misma fuente de alimentación empleada en la electroforesis (Figura M&M.30).

La membrana empleada para la transferencia en esta ocasión es una membrana de PVDF por lo que antes de realizar la transferencia es necesario activarla. Para ello la membrana se sumerge en metanol 99% durante 5 minutos y después se hierve en PBS 5 minutos adicionales. Por ultimo la membrana se bloquea con 2,5% de leche desnatada en polvo Biorad en TPBS en agitación suave durante 20 minutos.

La composición del tampón de transferencia es Glicina 190 mM, Metanol 20%, SDS 0,005% en Tris-HCl 25mM a pH 8,4. (Tabla M&M.8)

Tabla M&M.8. Composición del tampón de transferencia, solución de tinción Rojo Ponceau S, Composición de PBS, TPBS y tampón de bloqueo con TPBS-leche.

<i>Tampón de transferencia</i>	
Glicina	190 mM
Metanol	20%
SDS	0,005%
Tris-HCl	25mM
pH 8,4	--

<i>Colorante Rojo Ponceau S</i>	
Rojo Ponceau S	0,1%
Ácido acético	5%
H ₂ O _d	

	Componente	Concentración final	Cantidad para 1 L
PBS	NaCl (mw: 58.4 g/mol)	138mM	8,06 g
	KCl (mw: 74.551 g/mol)	3mM	0,22 g
	Na ₂ HPO ₄ (mw: 141.96 g/mol)	8,1mM	1,15 g
	KH ₂ PO ₄ (mw: 136.086 g/mol)	1,5 mM	0,20 g
	H ₂ O _d	--	1 L
	pH	7,4	
TPBS	PBS		1 L
	Tween 20	0.05%	0,5 ml
Tampón de bloqueo TPBS-Leche	TPBS		1 L
	Leche desnatada en polvo	1%	10 g

Sobre una bandeja se deposita el soporte del equipo de transferencia y se añade un volumen suficiente de tampón de transferencia para cubrir el soporte. En el polo negativo del equipo de transferencia se coloca la esponja y tres capas de papel de filtro evitando la formación de burbujas. El gel de electroforesis se coloca sobre estos papeles de filtro asegurándose de retirar cualquier burbuja. Sobre el gel se deposita la membrana de transferencia activada nuevamente prestando atención a evitar cualquier burbuja. Finalmente se completa el sistema con otras tres capas de papel de filtro y la esponja sobre el polo positivo (figura M&M.31). La presencia de burbujas durante la transferencia imposibilita la migración de la región afectada generando una grave pérdida de información. La migración de las proteínas se produce del polo negativo (Gel) hacia el polo positivo (Membrana) mediante la carga negativa del SDS unido a las proteínas. La transferencia se realiza a 310 mA durante 90 minutos en el equipo de transferencia Minitrans-blot de Biorad, empleando el tampón de transferencia en baño de hielo.

- (1) Soporte del polo negativo (negro)
- (4) Esponja + Papel de Filtro x3
- (2) Gel
- (3) Membrana de transferencia
- (4) Esponja + Papel de Filtro x3
- (1) Soporte del polo positivo (transparente/rojo)

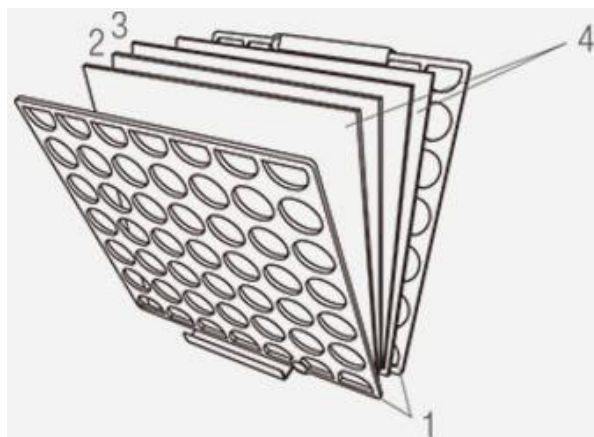


Figura M&M.31. Esquema del equipo de transferencia.

A la membrana transferida se le realiza una tinción con Rojo Ponceau S (Sigma) al 0,1% en ácido acético 5% en agua durante unos 15 segundos para comprobar la correcta transferencia de las proteínas. Una vez terminada la comprobación se retira el colorante realizando lavados con TPBS hasta aclarado.

3.9.3.3. Incubación con anticuerpo primario.

Tras la comprobación de la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, el siguiente paso en el proceso es la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes. Estos anticuerpos presentan una especificidad mayor ante los péptidos seleccionados de las proteínas diana. No obstante ante un exceso de anticuerpos es posible que se formen uniones no específicas. Para reducir el efecto de inespecificidad se realiza una dilución de trabajo de los anticuerpos y se emplea proteína de leche en el tampón TPBS para evitar uniones inespecíficas en la membrana.

Para los anticuerpos empleados las diluciones de trabajo empleadas se muestran en la tabla M&M.9. La incubación de la membrana se realiza con tampón 1% leche en TPBS manteniendo en agitación suave a 4°C *overnight*.

Tabla M&M.9. Anticuerpos empleados en el western-blot y dot-blot con las diluciones de trabajo utilizadas.

Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie Huésped	Dilución de trabajo	Proveedor
Anti ERG2	Erg 2 (esterol C-8 isomerasa)	Conejo	1/5000	Propio
Anti ERG4	Erg 4 (esterol C-24 reductasa)	Conejo	1/5000	Propio
Anti ERG6	Erg 6 (esterol C-24 metiltransferasa)	Conejo	1/5000	Propio
Anti ERG11	Erg 11 (lanosterol C-14 demetilasa)	Conejo	1/5000	Propio
Anti β -actina	<i>House keeping protein</i>	Conejo	1/10000	Sigma-Aldrich
Antirabbit IgG HRP-linked	Anticuerpos de conejo	Cabra	1/10000	Cell signaling Technology

3.9.3.4. Incubación con anticuerpo secundario.

Tras dejar la incubación del anticuerpo primario hasta equilibrio, el exceso de anticuerpo no unido a la membrana se lava realizando 3 lavados de 5 minutos con TPBS en agitación suave.

Se prepara la dilución de trabajo del anticuerpo secundario en TPBS y se incuba durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. El anticuerpo secundario

(Cell signalling) AntiIg se encuentra conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) que será la enzima que catalice la señal quimioluminiscente.

Tras la incubación se retira el exceso de anticuerpo secundario con 3 lavados de 5 minutos de TPBS y se prepara la membrana para la visualización.

3.9.3.5. Visualización y procesado de imagen.

Para la visualización se incuba la membrana con el reactivo Pierce ECL2 para western-blotting substrate (Thermo Scientific) durante 4 minutos antes de realizar la captura de imagen. Esta técnica aprovecha la quimioluminiscencia de los ésteres de acridinio mediada por la peroxidasa de rábano (HRP) (**Weeks, 1983**).

La captación de imagen se realizó mediante Chemidoc™ Imaging System de Bio-Rad y la cuantificación de la intensidad se determina mediante el software ImageJ aprovechando la correlación entre intensidad de la señal y la concentración de proteína.

3.9.4. Dot-Blot

El Dot-Blot se realiza siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, sustituyendo la separación mediante electroforesis PAGE-SDS por la adición de diferentes cantidades (de 5 y 50 ng) en la membrana de los péptidos sintéticos. El ensayo permite comprobar la capacidad inmunogénica de los sueros obtenidos para la detección de los péptidos sintéticos. En la visualización no aparecen bandas si no puntos con una intensidad mayor o menor proporcional a la interacción de los anticuerpos con las proteínas diana de la muestra.

3.10. TOXICIDAD

3.10.1. Animales

Para los estudios de toxicidad aguda se han utilizado ratas Wistar de peso 150 ± 20 g (machos) y 121 ± 19 g (hembras), y para los estudios de toxicidad sub-crónica se han utilizado ratas Wistar de peso 103 ± 12 g (machos) y 94 ± 8 g (hembras), proporcionados por el Servicio de Animalario de la Universidad de Sevilla (Espartinas, Sevilla). Los estudios de toxicidad se han llevado a cabo en el Animalario de la

Facultad de Farmacia, por lo que los animales se dejaron aclimatar a la nueva instalación durante una semana. Se distribuyeron en tres animales por jaula, con libre acceso a agua a alimentación (Panlab, Barcelona) a lo largo de todo el tiempo. Las condiciones de mantenimiento de los animales fueron las siguientes, temperatura: 23 ± 2 °C, humedad relativa: 50-70%, ventilación (renovación del aire): 10-20 veces/hora, iluminación: 150-300 lux con ciclos iluminación-oscuridad de 12 horas. Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones y guía del Comité ético de experimentación animal de la Universidad de Sevilla, realizándose en colaboración con la Dra Isabel Moreno Navarro del Departamento de Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla.

3.10.2. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda (TA) se ha llevado a cabo para evaluar cualquier efecto adverso causado por una ingesta oral excesiva de champiñones enriquecidos en vitamin-D2 por irradiación/tratamiento con luz-UVB. Para lo que se han utilizado 24 animales, divididos en cuatro grupos: grupo control (TA-0) y 3 grupos de tratamiento (TA-1, TA-2 y TA-3), cada grupo formado por 6 animales (3 machos y 3 hembras) (Tabla-M&M.10)

Tabla-M&M.10. - Distribución de los grupos control y tratados para el estudio de toxicidad aguda.

Grupo	TA-0	TA-1	TA-2	TA-3
n	6	6	6	6
Machos	3	3	3	3
Hembras	3	3	3	3
Dosis (mg/kg)	0	300	3000	5000

Tras 12 horas de ayuno, a cada animal se le administró por vía oral, mediante sonda gástrica, una única dosis de champiñones enriquecidos en vitamin-D2 por irradiación/tratamiento con luz-UVB homogenizada en H₂O_d (1:1), 2-3 ml, equivalente a una dosis de 300, 2000 o 5000 mg/Kg p.c., mientras que al grupo control se le han administrado 10 ml de H₂O_d/Kg p.c. Tras la administración de la dosis, los animales se han dejado con libre acceso a agua y alimento y se ha observado si había cambios en el

comportamiento, síntomas tóxicos y muerte, durante la 1ª hora, a las 4, 8 y 24 horas. Tras estas observaciones iniciales, los animales se han observado diariamente durante 14 días más, fundamentalmente síntomas tóxicos y muertes. Cualquier efecto adverso o extraño como hipoactividad, erección del pelo, salivación y síncope fueron evaluados inmediatamente después de la administración de las correspondientes muestras. El peso se midió los días 1, 7 y 14, la ingesta de agua y alimento se registró cada dos días tomando nota de la pérdida y/o ganancia de peso. Todos los animales, una vez sacrificados, fueron sometidos a un análisis necrótico básico, analizando los órganos al microscopio (Figura M&M.32.).

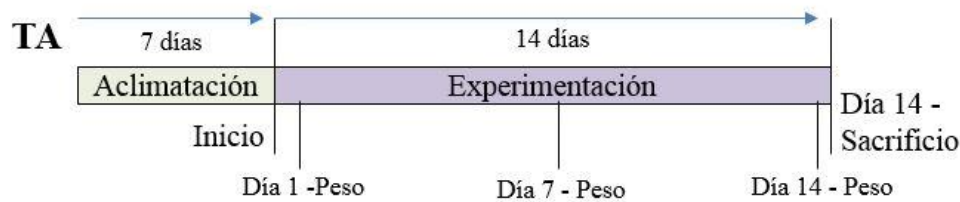


Figura-M&M.32. Planificación del ensayo de Toxicidad Aguda.

3.10.3. Toxicidad subcrónica

La toxicidad sub-crónica (TS-c) se ha realizado a lo largo de 91 días con el fin de obtener información sobre los posibles peligros para la salud que pueden surgir de la exposición repetida durante un período prolongado de tiempo al consumo de champiñones enriquecidos en vitamin-D2 por irradiación/tratamiento con luz-UVB. Para ello se ha utilizado 60 ratas Wistar distribuidas al azar en tres grupos: un grupo control (TS-c-0) y dos grupos de tratamiento (TS-c-1 y TSc-2), cada uno compuesto por 20 animales (10 machos y 10 hembras) (Tabla-M&M.11).

Tabla-M&M.11. - Distribución de los grupos control y tratados para el estudio de toxicidad subcronica.

Grupo	TS-c-0	TS-c-1	TS-c-2
n	20	20	20
Machos	10	10	10
Hembras	10	10	10
Dosis (mg/kg)	0	250	500

A las ratas sometidas a tratamiento, grupos TS-c-1 y TSc-2, se les ha administrado por vía oral, mediante sonda gastrointestinal, una dosis de 250 y 500 mg/Kg p. c., y día durante 91 días (13 semanas), mientras que al grupo control (TS-c-0) se le ha administrado agua 10 ml/Kg p.c., y día, durante 91 días. 36 animales (12 animales por grupo, 6 machos y 6 hembras) fueron sacrificados a los 91 días, el resto de los animales de cada grupo se continuaron observando durante 28 días más (4 semanas) pero sin administración alguna de producto o agua, sacrificándose a los 119 días (17 semanas). Muestras de sangre se tomaron, tras los sacrificios, a los 91 y 119 días para análisis hematológicos y bioquímicos (Figura M&M.33). El peso y el consumo de agua y alimento se registraron cada semana a lo largo del periodo de experimentación.

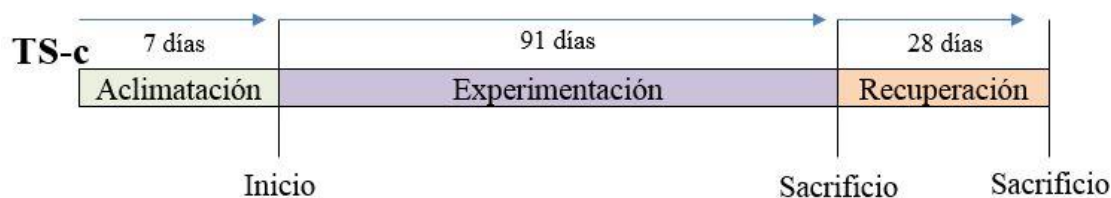


Figura-M&M.33 - Planificación del ensayo de Toxicidad Subcrónica.

3.10.4. Análisis de parámetros sanguíneos

Para tomar las muestras de sangre los animales se han anestesiado con pentobarbital sódico (1 ml/Kg, Exagon 400 mg/ml) mediante inyección intraperitoneal, y la sangre se ha obtenido por punción de la aorta abdominal en tubos con citrato sódico para el análisis de sangre completa. Los análisis hematológicos y bioquímicos se han realizado para 12 animales/grupo (6 animales/sexo) al finalizar el periodo de tratamiento (91 días) y 8 animales/grupo (4 animales/sexo) al finalizar el periodo de recuperación (28 días).

- Análisis hematológico

Los parámetro hematológicos analizados han sido los correspondientes a: i) Hematíes, hemoglobina, hematocrito e índices corpusculares [hematíes (HEM), hematocrito (HMT), hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM),

hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH)]. ii) Leucocitos y formula leucocitaria [leucocitos (LEU), neutrófilos (NEUT), eosinófilos (EOS), basófilos (BAS), linfocitos (LIN), monocitos (MON), plaquetas (PQT)]. Estos parámetros se han medido en el Servicio de Bioquímica del Hospital Virgen de Valme (Sevilla) en un analizador automático de hematología Roche Cobas 6000 (Roche, USA). iii) Los parámetros de coagulación [tiempo de trombina parcial activada (TTPA) y tiempo de protrombina (TP)] se han analizado en un analizador semiautomático Maccura BCS-04 (Maccura Biotechnology Co., Ltd., Japón).

- **Análisis bioquímicos**

El análisis de los parámetros bioquímicos se han realizado en suero, obtenido por centrifugación de la sangre sin anticoagulante a 1.500 x g durante 15 min y congelados a -20°C hasta su análisis. Los parámetros bioquímicos analizados han sido: alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) albúmina (ALB), globulina (GLB), razón albumina/globulina (Alb/Glb), proteína total (PT), bilirrubina total (BIT), creatinina (CREA), ácido úrico (AU), urea (UREA), creatina-quinasa (CK), triglicéridos (TG), colesterol total (CT), lactato deshidrogenasa (LDH) y glucosa (GLU). Todos ellos se han analizado en un autoanalizador completamente automatizado AU480 (Beckman Coulter, USA). Los iones Na⁺, K⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ se han determinado en un analizador de electrolitos AVL9181 (Roche, USA).

- **Peso de órganos y análisis histopatológico**

Una vez tomadas las muestras de sangre, los animales se sacrificaron, y se realizaron necropsias de todos los animales al final del periodo de tratamiento y de recuperación. Se extirparon los siguientes órganos: corazón, bazo, hígado, pulmones cerebro, riñones, timo, glándula adrenal, útero, ovarios y testículos, y se pesaron.

Para los análisis histopatológicos, realizados en el Departamento de Patología Celular del Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla), se han utilizado únicamente los órganos correspondientes a animales de grupo tratado con la dosis más alta (500 mg/Kg p.c.) y animales del grupo control de ambos sexos. Todas las muestras, de 4 µm de espesor, de los diferentes órganos, se han fijado en tampón de formalina neutra al 10% y se han teñido con el colorante hematoxilina-eosina, y se han

analizado/examinado al microscopio (Leica DC-300, Weltzar, Alemania), y el análisis histopatológico ha sido realizado por un patólogo del Departamento de Patología Celular del Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla), que no conocía la procedencia de las muestras.

3.11.BIOACCESIBILIDAD

3.11.1. Medida de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la vitamina-D2

El estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la vitamina-D2 de *A. bisporus* irradiado/tratado con luz-UVB, se ha llevado a cabo mediante una simulación *in vitro* del proceso de digestión (bioaccesibilidad) y absorción intestinal utilizando células Caco-2 (biodisponibilidad), tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura-M&M.34., en colaboración con el laboratorio del Dr. Sentoyas de la Universidad Autónoma de Madrid.

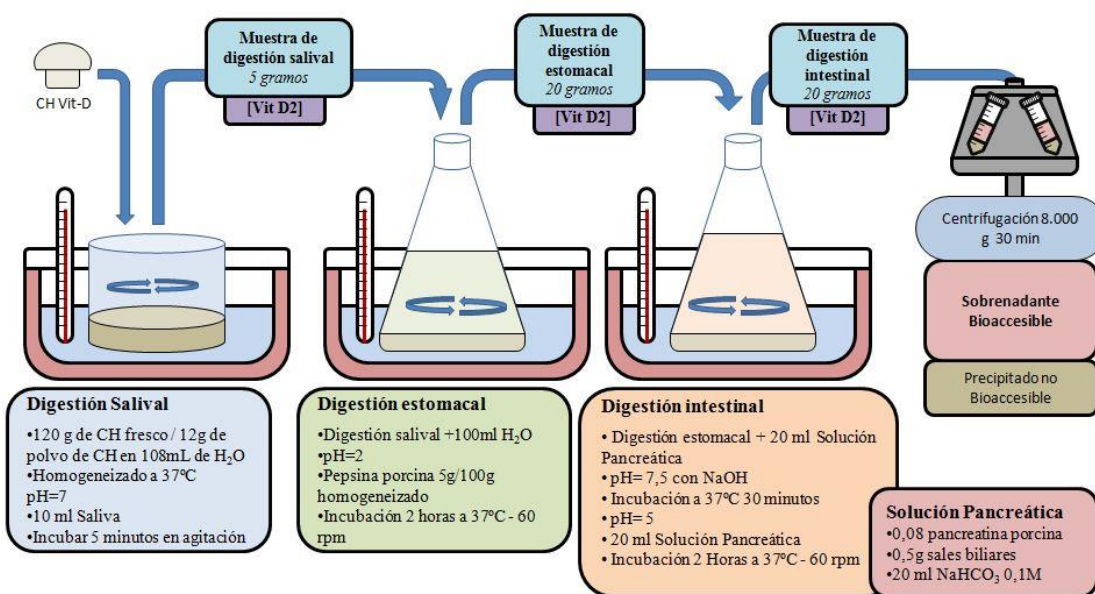


Figura-M&M.34. Representación esquemática del proceso de digestión “*in vitro*”.

- ***Digestión in vitro***

El estudio se ha realizado utilizando 120 g de champiñones frescos o 12 g de polvo de champiñón (cantidad equivalente), dependiendo si el estudio se ha realizado con materia fresca o con materia seca.

- ***Masticación***

La muestra (120 g p.h.; ó 12 g p.s., resuspendidos en 108 ml de H₂O) se mezcló con 10 mL de saliva humana obtenida de voluntarios y 10 mL de H₂O y se homogenizó durante 5 minutos en un homogenizador tipo Potter. Una vez homogenizado se separó una muestra (aproximadamente 5 g del homogeneizado) para la determinación de la concentración de vitamina-D2 tras el proceso de masticación.

- ***Digestión estomacal***

La muestra procedente de la digestión salival se diluyó con 100 mL de agua y el pH se ajustó a 2 mediante la adición de HCl 6M. Una vez ajustado el pH, se añadió una cantidad de solución de pepsina porcina en proporción 0,5 g de pepsina/100 g homogeneizado (0,8 g de pepsina (Sigma-Aldrich) en 5 mL HCl 0,1 M) y se incubó durante 2 h a 37°C con una agitación rotacional lenta a 60 rpm. Seguidamente, se separó una muestra (aproximadamente 20 g), se liofilizó y se guardó a -80°C, para calcular la concentración de vitamina-D2 después de la digestión estomacal.

- ***Digestión intestinal***

La mezcla resultante de la digestión estomacal (aproximadamente 220 g) se mezcló con 20 mL de solución pancreática (0,08 g de pancreatina porcina (Sigma-Aldrich) y 0,5 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) en 20 mL de NaHCO₃ 0,1M) y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 0,5 M. Seguidamente, se incubó durante 30 min y se midió el pH, que deberá haber bajado a aproximadamente 5. Si ésto no se produce, se ajusta a dicho pH con HCl 6 M. Seguidamente, se añadieron otros 20 mL de la solución pancreática y se incubó hasta 2 h a 37°C con una agitación rotacional lenta a 60 rpm. Se separó una muestra (aproximadamente 20 g), se liofilizó y se guardó a -80°C, para calcular la concentración de vitamina-D2 después de la digestión intestinal.

La preparación obtenida tras la digestión es una mezcla de un sobrenadante líquido que correspondería a la parte que los enterocitos intestinales podrían adsorber y un precipitado sólido que atravesaría el intestino y que posteriormente sería o bien asimilado por las bacterias del colon (microbiota intestinal) o bien eliminado en las heces. Por lo tanto la concentración de vitamina-D2 a este nivel nos proporciona información sobre la biaccesibilidad de la vitamina-D2 de los champiñones irradiados/tratados con luz-UVB.

3.12.BIODISPONIBILIDAD

Para estudiar la absorción intestinal *in vitro* (equivalente a la biodisponibilidad), se ha utilizado la línea celular Caco-2 (Invitrogen, Barcelona) procedente de adenocarcinoma de colon humano. Las células se han mantenido en el medio Dubelcco's Modified Eagle's (DMEM) con un alto contenido en glucosa (4,5 g/L) y suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de HEPES, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de glutamina.

Previamente a la realización de los ensayos de absorción, se ha analizado la toxicidad del sobrenadante de la digestión intestinal (vitamina D2) frente a monocapas de células Caco-2, utilizando diferentes cantidades sobrenadante (diferentes concentraciones de vitamina D2).

3.12.1. Medida de la absorción intestinal in vitro

Para llevar a cabo los ensayos de absorción se han utilizado células Caco-2 entre los pases 30 y 45. Empleándose placas de 12 pocillos Transwell® (Costar, Corning, NY, USA) que constan de una zona apical y otra basolateral separadas entre si por una membrana de poliéster semipermeable (Figura-M&M.35).

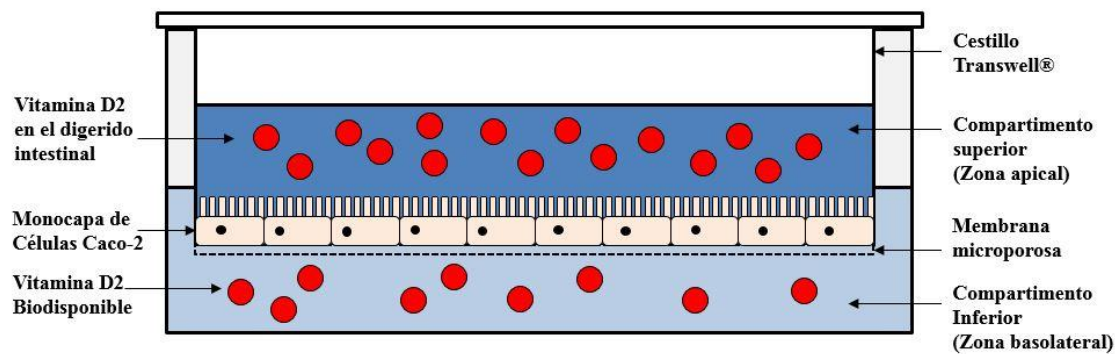


Figura-M&M.35. Esquema de un pocillo de las placas Transwell® donde las células Caco-2 crecen sobre una membrana cubriendo toda la superficie y dejando separados los compartimentos apical y basolateral

Los ensayos se han llevado a cabo sembrando las células a una densidad de 10^5 células/cm² sobre la membrana contenida en el soporte de cada pocillo (poro 0,4 μ m, diámetro, pocillo 12 mm de diámetro, 1,1 cm² de superficie de crecimiento), añadiendo medio de cultivo tanto en la zona apical (750 μ L) como basolateral (1,5 mL). El medio de cultivo se ha reemplazado cada 2 días permitiendo que las células Caco-2 crezcan sobre la membrana formando una monocapa (cubriendo toda la superficie) y que posteriormente se diferencien formando el borde de cepillo característico de los enterocitos intestinales. Todo el proceso dura aproximadamente 21 días.

Antes de realizar los estudios de absorción (biodisponibilidad) se procedió a comprobar la integridad de la monocapa de células. Lo que se llevó a cabo midiendo el potencial transmembrana (PTM), y la diferenciación celular (formación de vellosidades). El PTM se midió utilizando un voltímetro Evom (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) y la diferenciación se corroboró mediante la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA).

Una vez medido el PTM (que debe ser $> 250 \Omega \text{ cm}^2$) y corroborada la diferenciación celular (actividad FA 12 - 14 mUI/mg proteína) se añadió a la zona apical del pocillo una determinada cantidad del sobrenadante obtenido tras la digestión intestinal disuelto (no tóxica para Caco-2) en 750 μ L de medio de cultivo, y en la zona basolateral se añadieron 1,5 mL de medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 3h y tras dicho tiempo se recuperó el medio de cultivo tanto de la zona apical como de la basolateral para su posterior análisis en vitamina-D2.

3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de significancia para la comparación de medias de los grupos se obtuvieron empleando análisis de varianza (ANOVA unifactorial) con al menos tres replicas aplicando los test de Tukey y Student-Newman-Keuls. Para el análisis estadístico se usó el software Graphpad InStat 3.10.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo del cultivo de hongos y setas comestibles, particularmente el de champiñón (*Agaricus bisporus*), ha experimentado grandes e importantes cambios en los últimos 20 años (**Feeney y col., 2014**), si bien, la mayoría de ellos, por no decir todos, encaminados a la obtención de mayores producciones (productividad) y menos contaminaciones (seguridad). Sin embargo, debido a su composición, los hongos y setas comestibles, no sólo deberían contemplarse como un buen y sabroso alimento, sino que además, en determinados casos, podrían ser utilizados también como alimentos saludables en el tratamiento y/o prevención de algunas enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, enfermedades hepáticas, envejecimiento, etc. (**Vetter, 2019; Gil-Ramirez y col., 2018**). Pero para ello es necesario incrementar su contenido en determinados metabolitos, tales como ergosterol (precursor de la vitamina-D2, ergotioneina, polifenoles, etc., o minerales. selenio o litio, etc.

Por regla general las mejoras en el cultivo de hongos y setas comestibles se han llevado a cabo mediante la suplementación del compost (**Pardo-Gimenez y col., 2012**). Si bien, en la mayoría de los casos, el estudio se ha centrado en el análisis de la productividad y de las mejoras en relación con la seguridad del cultivo (contaminaciones) y la estabilidad post-cosecha, como hemos comentado más arriba, habiéndose prestado, hasta la fecha, muy poca atención a las posibilidades de incrementar el contenido en determinados metabolitos y/o minerales con efectos beneficiosos para salud. Por ello en el presente trabajo hemos abordado la posibilidad de incrementar el contenido en ergosterol (precursor de la vitamina-D2) mediante la suplementación del medio, tanto para la obtención de champiñones con un contenido de vitamina-D2, tras su irradiación con luz UV, equivalente a la dosis diaria en una ración (80 – 100 g, p.h), como para la obtención de preparados ricos en ergosterol susceptibles de ser utilizados en el tratamiento de hipercolesteronemias y por tanto en la prevención de enfermedades cardíacas (**Gil-Ramirez y col., 2018**), como en cosmética en el desarrollo de cremas de protección solar, etc.

Con el fin de llevar a cabo el presente estudio se planteó el siguiente plan de trabajo: i) Preparación y caracterización de suplemento, ii) Formulación de medios de cultivo y compost, iii) Cultivo/crecimiento en diferentes medios, iv) Irradiación-UV de champiñones, v) Toxicidad y biodisponibilidad de los componentes de champiñones irradiados (enriquecidos en vitamina-D2).

4.1. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUPLEMENTOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

4.1.1. Recopilación de sub-productos

De acuerdo con el diseño experimental, lo primero en que nos centramos fue en el acopio de materias primas (subproductos agroindustriales) en cantidades lo suficientemente grande como para no vernos comprometidos en el desarrollo de los experimentos y utilizar siempre los mismos suplementos, evitando así el efecto debido a la variabilidad en la composición de los mismos.

En la Tabla-R1 se muestran las materias primas o subproductos agroindustriales utilizados en este estudio, así como los suplementos derivados de ellas y utilizados como suplementos en el cultivo de champiñón (*A. bisporus*). Como podemos observar, los subproductos utilizados derivan, de la industria aceitera (alperujo y hoja de olivo) que nos permiten obtener los siguientes suplementos: harina de alperujo (HALP), harina de hoja de olivo (HHO) y extracto de hoja de olivo (EHO); de la industria conservera del champiñón: tallos de champiñón y líquido de escaldado que nos permiten obtener los siguientes suplementos: harina de tallos de champiñón (HTCH), fracción quitina/glucano (F-Q/G) y líquido de escaldado concentrado 10 veces (LE-10x).

Tabla-R1. Materias primas y/o suplementos utilizados en la suplementación del cultivo de champiñón (*Agaricus bisporus*).

Materia Prima	Suplemento	Procedencia
Alperujo*	Harina de Alperujo (HALP)	Almazara Instituto de la Grasa (Sevilla)
Hoja de olivo*	Harina de Hoja de Olivo (HHO)	Almazara Instituto de la Grasa (Sevilla)
Hoja de olivo*	Extracto de Hoja de Olivo (EHO)	Almazara Instituto de la Grasa (Sevilla)
Tallos de Champiñón**	Harina de Tallos de Champiñón (HTCH)	Grupo Riberebro S.A. (Haro, La Rioja)
Tallos de Champiñón**	Fracción Quitina/Glucanos (F-Q/G)	Grupo Riberebro S.A. (Haro, La Rioja)
Líquido de escaldado**	Líquido de Escaldado concentrado 10 veces (LE-10x)	Grupo Riberebro S.A. (Haro, La Rioja)

*Industria aceitera; **Industria conservas champiñón

¿Por qué estos subproductos? La razón es porque son subproductos muy abundantes y baratos, y a pesar de que algunos (alperujo y hojas de olivo) son temporales, es decir, se obtienen sólo durante un determinado tiempo, se obtienen en tales cantidades que almacenados adecuadamente pueden cubrir todo el periodo anual de uso. Los tallos de champiñón y el líquido de escaldado no dependen de la temporalidad, se producen a lo largo de todo el año.

4.1.2. Preparación de los suplementos

El alperujo una vez recibido de la almazara se procedió a su secado con aire a 50°C en una estufa con ventilación forzada hasta peso constante. El producto seco se molió en un molino de pistón equipado con una malla de 0,5 mm. Obteniéndose un polvo fino uniforme que hemos denominado harina de alperujo (HALP) (ver Figura-R.1a).

Análogamente, las hojas de olivo una vez recibidas de la almazara se secaron con aire a 50°C en una estufa con ventilación forzada hasta peso constante, y una vez secas se molieron en un molino de pistón equipado con una malla de 0,5 mm. El polvo fino uniforme resultante se denominó harina de hoja de olivo (HHO) (ver Figura-R.1b).

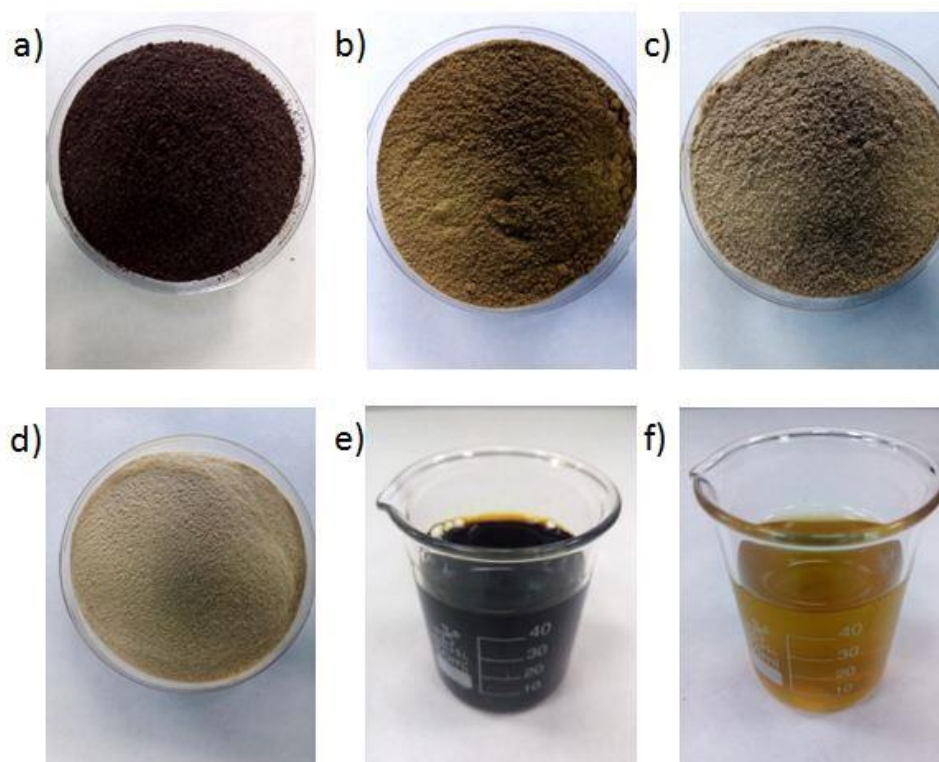


Figura-R1. Suplementos utilizados en el cultivo de champiñón (*A. bisporus*) en este estudio: a) HALP, b) HHO, c) HTCH, d) FQ/G, e) EHO, f) LE-10x.

La HHO tras su resuspensión (50 gr/litro) se ha sometido a una extracción hidroalcohólica (70%), y el extracto obtenido se ha concentrado 10 veces al vacío, en rotavapor, dando lugar a un producto que hemos denominado extracto de hoja de olivo (EHO) (ver Figura-R.1e).

Los tallos de champiñón una vez lavados, para eliminar restos de compost y tierra, se han secado con aire a 50°C en una estufa con ventilación forzada hasta peso constante. El producto seco se molió en un molino de pistón equipado con una malla de 0,5 mm. Obteniéndose un polvo fino uniforme que hemos denominado harina de tallos de champiñón (HTCH) (ver Figura-R.1c).

La HTCH resuspendida en tampón fosfato 50 mM, pH 8,5 en una proporción del 10% se ha hidrolizado con la proteasa Alcalasa® a una relación E/S = 0,03 v/p, a 55°C durante 180 min manteniendo el pH constante, alcanzando un grado de hidrólisis de 6,72 (Figura-R.2). Seguidamente el hidrolizado se ha centrifugado a 10.000 x g, eliminándose el sobrenadante (hidrolizado proteico), recuperando el precipitado, que una vez secado a 55°C hasta peso constante, se ha molido en un molino de pistón equipado con una malla de 0,5 mm, obteniéndose un polvo fino uniforme que hemos denominado fracción enriquecida en quitina/glucanos (F-Q/G) (ver Figura-R.1d).

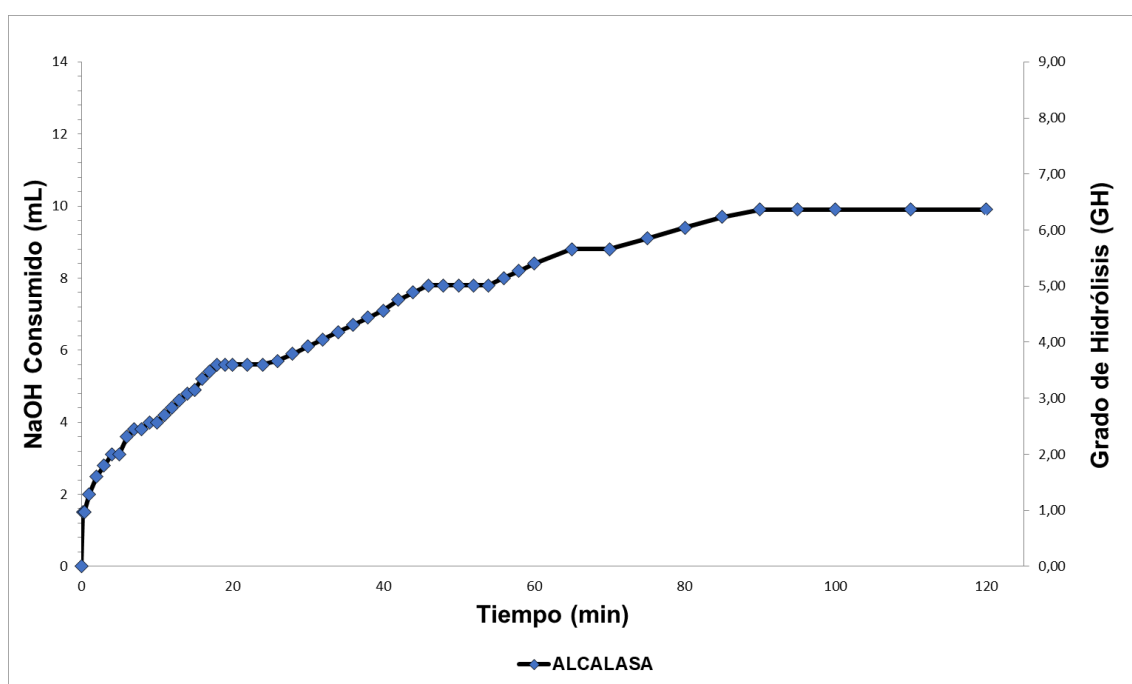


Figura-R.2. Curva de hidrólisis de la HTCH con Alcalasa®

El líquido de escaldado se ha concentrado al vacío, a 70°C y un vacío de 30-40 kPa, 10 veces dando lugar a un producto que hemos denominado líquido de escaldado 10X (LE10X) (ver Figura-R.1f).

4.1.3. Caracterización de los suplementos.

La caracterización de los suplementos se ha llevado a cabo mediante la determinación de los siguientes parámetros: humedad, materia orgánica (MO), grasa bruta, nitrógeno total (N_t), proteína ($N_t \times 5,5$, $\times 4,38$ ó $\times 6,24$, según casos), polifenoles, hidratos de carbono totales, etc., y pH. En la Tabla-R2 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla-R2. Composición básica de los suplementos utilizados en el cultivo de champiñón (*A. bisporus*) en este estudio. (Datos expresados en % p.s.)

	HALP	HHO	EHO	HTCH	F-Q/G	LE-10x
Humedad ^{&}	11,3±3,8	6,8±1,1	76,8±3,7	7,3±1,2	7,4±0,5	91,1±2,1
Peso seco*	88,7±3,8	93,2±1,1	23,2±3,7	92,7±1,2	92,6±0,5	8,9±2,1
Cenizas*	11,4±1,2	9,4±3,1	5,2±0,8	8,8±2,3	7,6±3,7	21,7±1,3
MO*	88,6±1,2	90,6±3,1	94,8±0,8	91,2±2,3	92,4±3,7	78,3±1,3
Grasa*	7,8±0,8	6,3±0,6	23,8±1,6	3,2±0,4	n.d.	n.d.
N_t^*	1,5±0,2	0,9±0,1	3,4±0,4	5,2±0,3	0,4±0,1	3,8±0,3
Proteína ^{&}	8,3±1,1 ^a	5,0±0,5 ^a	18,7±2,2 ^a	28,6±1,7 ^b	1,7±0,2 ^b	23,7±1,9 ^c
HC+Otros ^{&}	72,5±0,7	79,3±0,7	52,3±3,0	59,4±5,1	90,7±0,4	57,4±0,6
pH*	5,5±0,3	6,9±0,2	7,1±0,2	6,9±0,3	8,1±0,3	6,8±0,2
C*	41,8±0,5	40,5±0,3	42,2	43,1±0,2	48,7±0,6	42,6±0,4
Relación C/N	27,9	45,0	12,4	8,3	121,7	11,21

[&]Datos calculados; *Datos experimentales; ^afactor 5,5; ^bfactor 4,38; ^cfactor 6,24

Analicemos con algo más de detalle la composición de los suplementos.

4.1.3.1. Harina de Alperujo (HALP)

El alperujo seco y molido es una especie de harina de color negruzco, con un contenido de humedad del $11,3 \pm 3,8\%$, y peso seco del $88,7 \pm 3,8\%$; correspondiendo el $11,4 \pm 1,2\%$ (p.s.) a cenizas, y el $88,6 \pm 1,2\%$ (p.s) a materia orgánica. Con un contenido en grasa del $7,8 \pm 0,8\%$, p.s., en proteína del $8,3 \pm 1,1\%$, p.s., y en hidratos de carbono más otros (fundamentalmente lignina) del $72,5 \pm 0,7\%$, p.s. (ver Tabla-R2).

4.1.3.2. Harina de hoja de olivo (HHO)

La hoja de olivo seca y molida es una especie de harina de color marrón-verdoso, con un contenido de humedad del $6,8 \pm 1,1\%$, y peso seco del $93,2 \pm 1,1\%$; correspondiendo el $9,4 \pm 3,1\%$ (p.s.) a cenizas, y el $90,6 \pm 3,1\%$ (p.s) a materia orgánica. Con un contenido en grasa del $6,3 \pm 0,6\%$, p.s., en proteína del $5,0 \pm 0,5\%$, p.s., y en hidratos de carbono más otros (fundamentalmente celulosa y hemicelulosa) del $79,3 \pm 0,7\%$, p.s. (ver Tabla-R2)

4.1.3.3. Extracto de hoja de olivo (EHO)

Una vez extraída la HHO con etanol al 70% y concentrado el extracto soluble 10 veces, se ha obtenido un líquido verde-oscuro, ligeramente viscoso, que hemos denominado extracto de hoja de olivo (EHO) con un contenido de humedad del $78,8 \pm 3,7\%$, y peso seco del $23,2 \pm 2,7\%$; correspondiendo el $5,2 \pm 0,8\%$ (p.s.) a cenizas, y el $94,8 \pm 0,8\%$ (p.s) a materia orgánica; con un contenido en grasa del $23,8 \pm 1,7\%$, p.s., en proteína del $18,7 \pm 2,2\%$, p.s., y en hidratos de carbono más otros del $52,3 \pm 3,0\%$, p.s. (ver Tabla-R2)

4.1.3.4. Harina de tallos de champiñón (HTCH)

Una vez secados y molidos los tallos de champiñón se obtiene una harina de color marrón-claro, con un contenido de humedad del $7,3 \pm 1,2\%$, y peso seco del $92,7 \pm 1,2\%$; correspondiendo el $8,8 \pm 2,3\%$ (p.s.) a cenizas, y el $91,2 \pm 2,3\%$ (p.s) a materia orgánica. Con un contenido en grasa del $3,2 \pm 0,4\%$, p.s., en proteína del $28,6 \pm 1,7\%$, p.s., y en hidratos de carbono más otros del $59,4 \pm 5,1\%$, p.s. (ver Tabla-R2).

4.1.3.5. Fracción enriquecida en quitina/glucanos (F-Q/G)

Una vez tratada la HTCH con la proteasa Alcalasa®, el precipitado desproteinizado enzimáticamente se ha secado y molido, obteniéndose un polvo fino uniforme de color beis-blanco, que hemos denominado fracción enriquecida en quitina/glucanos (F-Q/G) ya que está constituida mayoritariamente por polisacáridos (glucanos insolubles y quitina, fundamentalmente). Esta F-Q/G tiene un contenido de humedad del $7,4 \pm 0,5\%$, y peso seco del $92,7 \pm 1,2\%$; correspondiendo el $7,6 \pm 3,7\%$ (p.s.) a cenizas, y el $92,4 \pm 3,7\%$ (p.s.) a materia orgánica; con un contenido en proteína del $1,1 \pm 0,5\%$, p.s., y en hidratos de carbono más otros (fundamentalmente quitina y glucanos) del $91,3 \pm 0,4\%$, p.s. (ver Tabla-R2).

4.1.3.6. Líquido de escaldado concentrado 10 veces (LE-10x)

Una vez concentrado el líquido de escaldado 10 veces, se obtiene un líquido amarillo-marrón claro, que hemos denominado LEx10, con un contenido de humedad del $91,1 \pm 2,1\%$, y peso seco del $8,9 \pm 2,1\%$; correspondiendo el $21,7 \pm 1,3\%$ (p.s.) a cenizas, y el $78,3 \pm 1,3\%$ (p.s.) a materia orgánica; con un contenido en proteína del $23,7 \pm 1,9\%$, p.s., y en hidratos de carbono más otros del $52,3 \pm 3,0\%$, p.s. (fundamentalmente productos solubles como azúcares, oligosacárido, sacáridos soluble, aminoácidos, oligopéptidos y péptidos- proteínas) (ver Tabla-R2)

Una vez preparados y caracterizados los suplementos se ha procedido al estudio del comportamiento de *A. bisporus* en diferentes medios de cultivo y composts.

4.2. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO/COMPOST DE *AGARICUS BISPORUS* CON DIFERENTES SUPLEMENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE ERGOSTEROL EN MICELIO Y EN CUERPOS FRUCTÍFEROS.

Preparados y caracterizados los suplementos, el siguiente paso fue la modificación del medio de cultivo/compost con cada uno de los suplementos para estudiar su efecto sobre la productividad/rendimiento, pero sobre todo analizar su efecto sobre la biosíntesis de ciertos metabolitos o componentes beneficiosos para la salud, tales como ergosterol (precursor de la vitamina D2), ergotioneína, etc.

Los métodos empleados para aumentar la productividad de determinados metabolitos de interés industrial, medico-farmacéutico y/o para la salud, generalmente se llevan a cabo por algunos de los siguientes dos métodos o aproximaciones: *i*) Por ingeniería metabólica de vías metabólicas (Nevoigt, 2008) o *ii*) Por aproximación fisiológico-nutricional basada en el conocimiento de su fisiología y respuestas ante determinados cambios del entorno, como por ejemplo modificaciones del medio de cultivo o crecimiento (Sonnleitner y Käppeli, 1986). Teniendo en cuenta que la Genética y Bioquímica de *A. bisporus* no está completamente desarrollada, en el presente estudio se ha utilizado la aproximación fisiológico-nutricional para estudiar el efecto de la suplementación del medio de cultivo: MLmd, MSmd/Agar y MSmd/Compost, con una serie de suplementos nutricionales procedentes de la industria agroalimentaria (HTCH, HHO, HALP, EHO y LE-10x), analizando su efecto sobre la producción de biomasa y el contenido en ergosterol, fundamentalmente, en el micelio y en los cuerpos fructíferos, sin dejar de lado el estudio de la productividad (Kg/m^2) en el caso del cultivo sobre compost.

Teniendo en cuenta que los cultivos de *A. bisporus* sobre compost tienen una larga duración, más de un mes, inicialmente abordamos el estudio a nivel de cultivos del micelio en medios líquidos y en medios sólidos sobre agar.

4.2.1. Cultivos en medio líquido mínimo definido (MLmd)

Los cultivos en medio líquido mínimo definido (MLmd), se han realizado tal y como se describe en el apartado correspondiente de M&M, a pH 5,5, 28°C y agitación (60 rpm) durante 7 días, tomándose muestra periódicamente a lo largo de los 7 días, evaluándose la producción de biomasa y el contenido de ergosterol. En la Figura-R.3 se muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para un cultivo de *A. bisporus* en MLmd durante 7 días, suplementado con HHO al 10%.

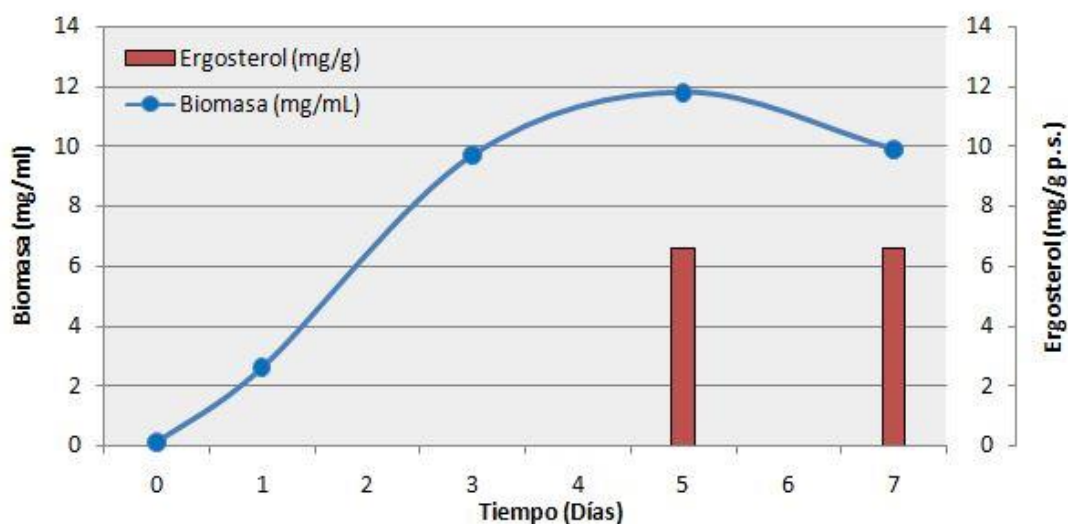


Figura-R.3. Evolución de la producción de biomasa y contenido en ergosterol en cultivos de *A. bisporus* en MLmd durante 7 días, suplementado con HHO al 10%.

En la Tabla-R3 se muestran los resultados obtenidos al crecer *A. bisporus* en MLmd, suplementado con los diferentes suplementos al 1, 5 y 10%, durante 7 días. Como se puede observar de los resultados expuestos en la Tabla-R3 los suplementos HALP, HHO y HTCH al 1%, 5% y 10% producen incrementos estadísticamente significativos, respecto del cultivo control o de referencia, tanto para la producción de biomasa como para el contenido de ergosterol en el micelio. Sin embargo, en el caso de los suplementos F-Q/G EHO y LE-10x no se observan diferencias estadísticamente significativas (ver Figura-5).

Tabla-R.3. Crecimiento (biomasa) y contenido de ergosterol de *A. bisporus* crecido en diferentes medios líquidos mínimos definidos (MLmd) suplementados con diferentes inductores.

Medio cultivo	Biomasa (mg/L)	Ergosterol (mg/g, p.s.)	n
MLmd (control)	6,8±0,6	4,08±0,53	5
MLmd+HALP (1%)	9,7±0,9	4,86±0,53	4
MLmd+HALP (5%)	12,1±1,1 ***	5,66±0,49	4
MLmd+HALP (10%)	12,2±0,7 ***	5,64±0,47	4
MLmd+HHO (1%)	10,2±0,3 *	5,14±0,53	4
MLmd+HHO (5%)	12,0±0,3 ***	6,67±0,52 **	4
MLmd+HHO (10%)	12,5±0,5 ***	6,60±0,36 **	4
MLmd+EHO (1%)	8,8±0,9	4,9±1,33	4
MLmd+EHO (5%)	9,2±0,6	5,6±1,51	4
MLmd+EHO (10%)	9,9±1,1 *	5,8±1,04	4
MLmd+HTCH (1%)	9,4±0,5	5,3±0,45	4
MLmd+HTCH (5%)	10,2±0,5 *	5,9±0,33	4
MLmd+HTCH (10%)	10,6±0,4 **	5,8±0,43	4
MLmd+F-Q/G (1%)	8,0±0,7	4,7±0,62	4
MLmd+F-Q/G (5%)	8,6±0,4	5,2±0,74	4
MLmd+F-Q/G (10%)	8,9±0,9	5,0±0,51	4
MLmd+LE10X (1%)	7,3±1,1	4,9±1,86	4
MLmd+LE10X (5%)	8,0±0,7	5,1±0,63	4
MLmd+LE10X (10%)	8,2±0,5	5,3±0,77	4

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

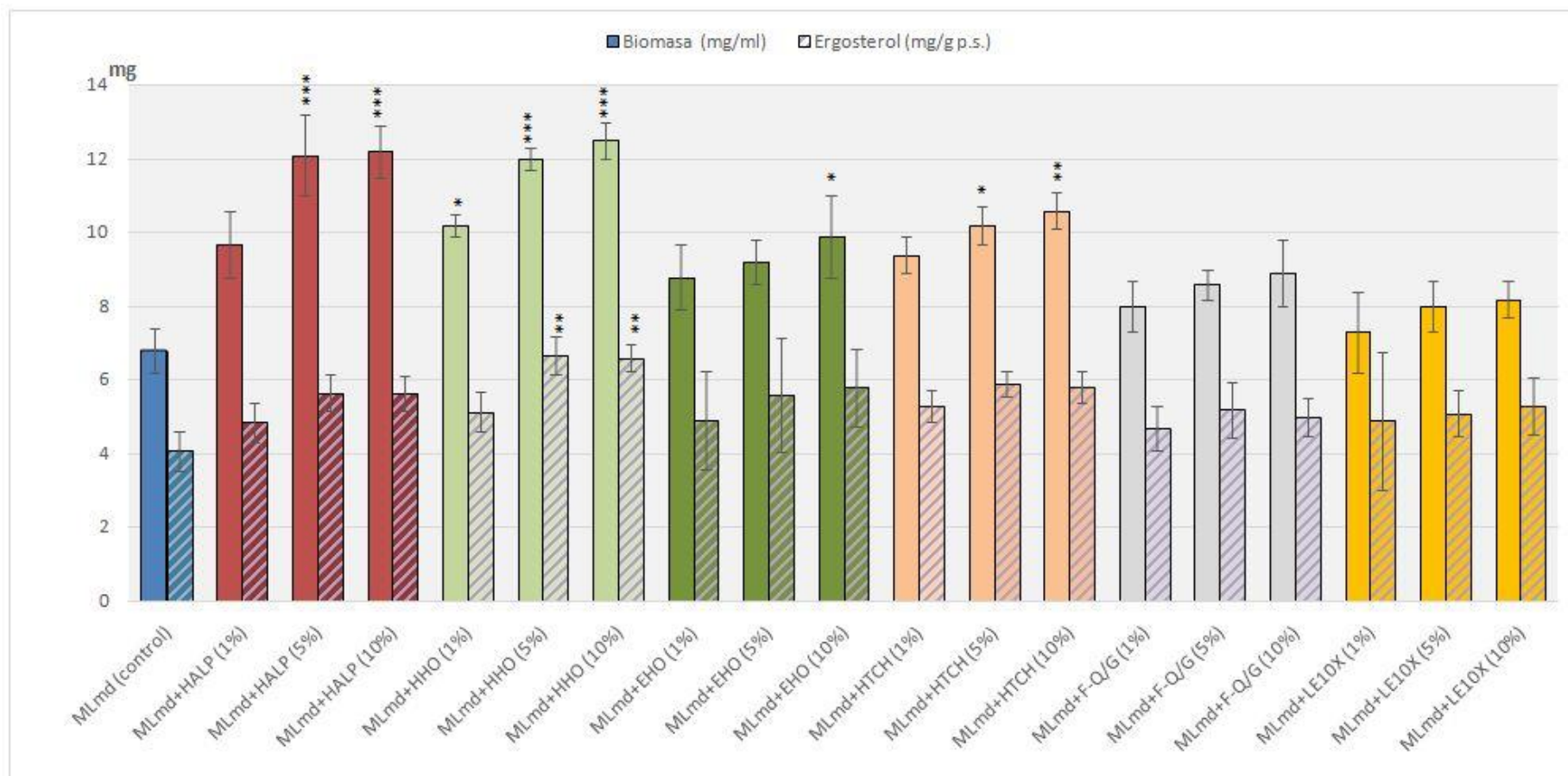


Figura R.4– Biomasa (mg p.s./ml) y ergosterol (mg/g p.s.) de los cultivos de *A. bisporus* en MLmd suplementados con los distintos suplementos.

Estos datos también nos indican que el incremento de biomasa fue mayor en presencia de los suplementos HALP, HHO y HTCH, probablemente debido a que la relación C/N (27,9, 45,0 y 8,3, respectivamente) en estos suplementos están dentro de los márgenes considerados óptimos para el desarrollo del champiñón (**Pardo-Gimenez y col., 2012**) mientras que en la F-Q/G la relación C/N es muy alta, 121,7, debido a su bajo contenido en nitrógeno proteico aporta poco beneficio al crecimiento, para el EHO y LE-10x la relación C/N es de 12,4 y 11,21, respectivamente, a pesar de tener una relación C/N optima, el desarrollo del hongo es menor, probablemente debido a que la forma molecular en la que está presente el C y el N en estos suplementos, en forma de monosacáridos y aminoácidos libres, predominantemente, no sea la más adecuada.

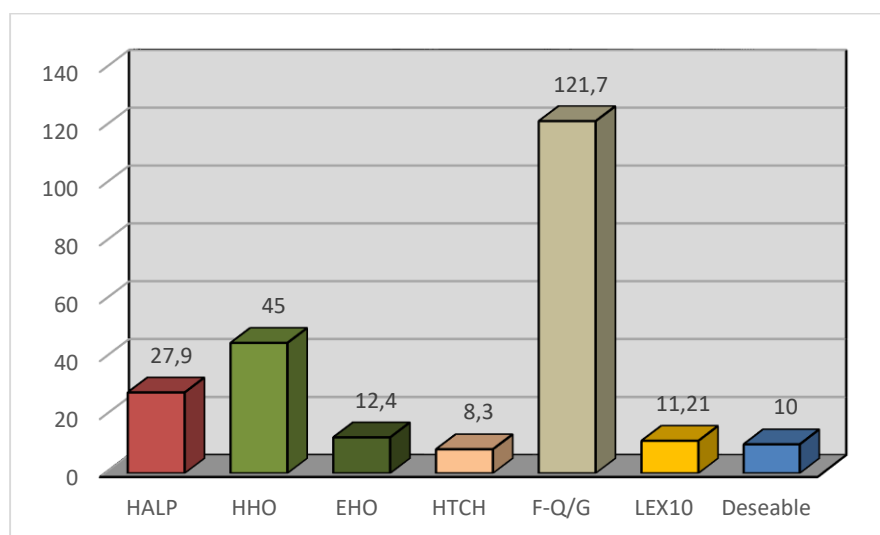


Figura R.5 – Relación C/N de los suplementos utilizados.

En relación con el contenido en ergosterol, estos datos, nos indican que también se observan diferencias estadísticamente significativas respecto del cultivo control para todas las suplementaciones. Además, mientras que en los cultivos al 1% y al 5% se observa un incremento estadísticamente significativo entre ellos, para los cultivos entre el 5% y el 10%, prácticamente no se observan diferencias. Por lo que se ha fijado como concentración de suplementación para cultivos líquidos el 5%, ya que por encima del 10% de suplementación el incremento en la concentración de ergosterol parece haber alcanzado un valor límite o *plateau*. Por lo que, desde un punto de vista práctico, suplementaciones más elevadas no tienen sentido. Por ello a partir de este punto seleccionamos el 5% como nivel de suplementación óptimo para posteriores estudios en este medio.

4.2.2. Cultivos en medio sólido mínimo definido/Agar (MSmd/Agar)

Los cultivos en medio sólido mínimo definido/Agar (MSmd/Agar), se han realizado tal y como se describe en el correspondiente apartado de M&M a pH 5,5, 28°C, sin agitación y en oscuridad, durante 14 días, evaluándose la producción de biomasa y el contenido en ergosterol a lo largo del periodo de cultivo.

Los resultados obtenidos para la producción de biomasa y contenido en ergosterol al crecer *A. bisporus* en los diferentes MSmd/Agar, suplementados con los diferentes suplementos anteriormente indicados, se muestran en la Tabla-R.4.

En este caso, al igual que en MLmd, los medios más eficientes, con los que se obtienen mayores concentraciones de biomasa y ergosterol son los suplementados con ALPM, HHO y HTCH a concentraciones de 5% y 10%. Si bien, en este caso, a diferencia de los cultivos en MLmd, a concentraciones del 1% de suplemento los valores obtenidos para el ergosterol muestran una tendencia al alza, si bien, no llegando a ser estadísticamente significativos. Por lo que también en este caso hemos seleccionado la suplementación al 5% como la más óptima.

En este caso, al igual que en el anterior, podemos señalar la razón C/N como la causa responsable de los incrementos observados para la biomasa y el contenido en ergosterol (ver Figura R.6).

A partir de los resultados, obtenidos mediante el crecimiento de *A. bisporus* en MLmd y en MSmd/Agar, suplementados convenientemente, se seleccionaron como suplementos a estudiar en MSmd/Composts: HALP, HHO y HTCH, ya que es con estos suplementos con los que se obtienen las mayores concentraciones de ergosterol ($6,63 \pm 0,34$ y $6,58 \pm 0,63$ mg/g p.s., cuando se suplementa con HTCH al 5% o 10% de suplementación, respectivamente (ver Figura R6).

Tabla-R.4. Crecimiento (biomasa) y contenido de ergosterol de *A. bisporus* crecido en diferentes medios sólidos mínimos definidos/Agar (MSmd/Agar) suplementados con diferentes suplementos.

Medio cultivo	Biomasa (mg/Placa)	Ergosterol (mg/g, p.s.)	n
MSmd/Agar (control)	6,0±0,4	4,12±0,43	4
MSmd/Agar + HALP (1%)	8,2±0,4 ***	5,01±0,43	4
MSmd/Agar + HALP (5%)	8,9±0,9 ***	5,16±0,39	4
MSmd/Agar + HALP (10%)	9,7±0,7 ***	5,14±0,52	4
MSmd/Agar +HHO (1%)	10,2±0,3 ***	5,14±0,53	4
MSmd/Agar +HHO (5%)	11,7±0,8 ***	6,57±0,63 **	4
MSmd/Agar +HHO (10%)	12,5±0,5 ***	6,60±0,86 **	4
MSmd/Agar +EHO (1%)	7,1±0,5*	4,12±0,8	4
MSmd/Agar +EHO (5%)	9,2±0,8 ***	5,79±0,7	4
MSmd/Agar +EHO (10%)	9,6±1,1 ***	5,83±1,9	4
MSmd/Agar +HTCH (1%)	9,4±0,5 ***	5,13±0,45	4
MSmd/Agar +HTCH (5%)	11,2±1,3 ***	6,63±0,34 *	4
MSmd/Agar +HTCH (10%)	11,8±0,8 ***	6,58±0,63 **	4
MSmd/Agar +F-Q/G (1%)	7,6±0,5 *	4,17±0,61	4
MSmd/Agar +F-Q/G (5%)	8,8±0,7 ***	5,13±0,77	4
MSmd/Agar +F-Q/G (10%)	8,9±0,9 ***	5,40±0,81	4
MSmd/Agar +LE10X (1%)	7,3±0,3 *	4,43±0,48	4
MSmd/Agar +LE10X (5%)	8,4±0,3 ***	5,02±0,56	4
MSmd/Agar +LE10X (10%)	8,6±0,7 ***	5,21±0,68	4

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

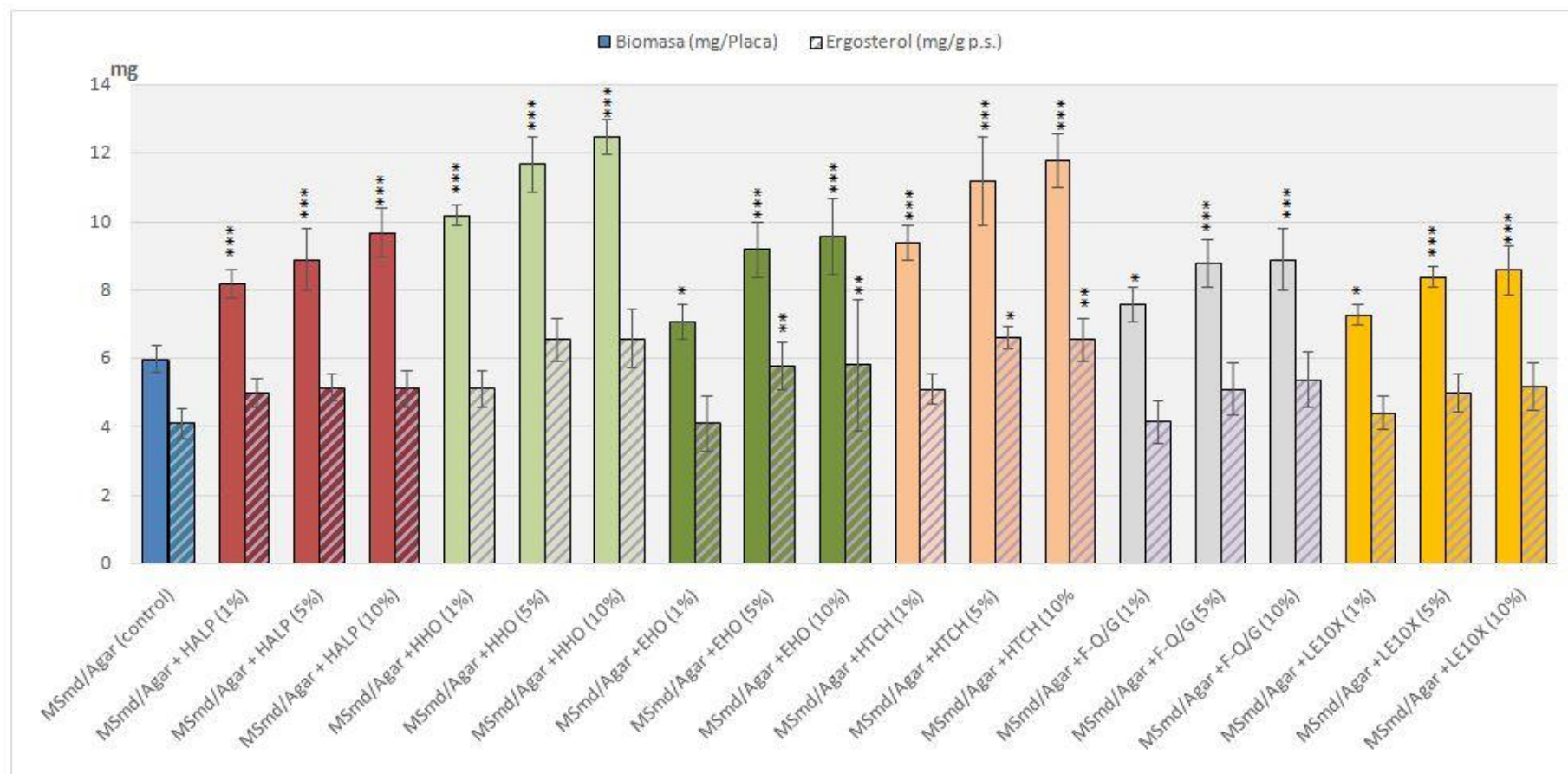


Figura R.6 - Biomasa (mg p.s./placa) y ergosterol (mg/g p.s.) de los cultivos de *A. bisporus* en MSmd/Agar suplementados con los distintos suplementos.

4.2.3. Cultivos en medio sólido mínimo definido/Compost (MSmd/Compost)

Los cultivos en medio sólido mínimo definido/Compost (MSmd/Compost) (Figura-R.7) se han realizado añadiendo el suplemento al compost o a la tierra de cobertura, utilizando dos concentraciones de suplemento: 50 g/Kg de compost o tierra de cobertura y 100 g/Kg de compost o tierra de cobertura. La adición se ha realizado añadiendo el suplemento conjuntamente con la semilla (en la inoculación) o mezclado con la tierra de cobertura.



Figura-R.7. Cultivo de champiñón (*A. bisporus*) en MSms/Compost suplementado con HTCH en cámara de cultivo del CITIUS (Universidad de Sevilla).

Los resultados obtenidos al crecer *A. bisporus* en los diferentes medios sólidos mínimos definidos/Compost (MSmd/Compost), suplementados al 5%, se muestran en la Tabla-R5 y Figuras R8 y R9., donde se además de la concentración en ergosterol (mg/g p.s.), se muestra también la productividad (Kg/m²), cuando el suplemento se añade conjuntamente con la semilla o en la tierra de cobertura.

En la Tabla-R.6 y Figuras R.8 y R.9 se muestran los resultados obtenidos al crecer *A. bisporus* en los diferentes medios sólidos mínimos definidos/Compost (MSmd/Compost), suplementados al 10% con HHO y HTCH, en relación con la concentración de ergosterol (mg/g p.s.) y la productividad (Kg/m²).

De los resultados obtenidos, se observa que los dos suplementos más apropiados para cultivar *A. bisporus* con niveles de ergosterol más elevados son la HTCH y la HHO al 5% ya que la diferencia observable al 10% no son estadísticamente significativas, ni para la producción de ergosterol (Figura R8), ni para la productividad (Figura R9). Por lo que a partir de este punto, esta fue la concentración de suplemento utilizada en los restantes estudios.

Un aspecto interesante desde un punto de vista práctico, es cuándo y dónde añadir el suplemento:

- i) en el compost, conjuntamente con la semilla (en la inoculación)
- ii) en la tierra de cobertura, mezclado con ella.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se ha concluido que, bajo nuestras condiciones, es indiferente, ya que los valores de ergosterol y productividad son prácticamente iguales. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, a nivel industrial, parece ser preferible la adición en la tierra de cobertura, por motivos de seguridad y comodidad.

Otro aspecto importante es la productividad de los cultivos (Kg/m²). En relación con la productividad, como se puede observar de los datos indicados en las Tablas R.5 y R.6 y las Figuras R.8 y R.9, los mejores valores se obtienen también al 5%, tanto cuando se crecen en compost suplementado con HTCH o HHO, ya que el incremento observado al 10%, con ambos suplementos, no son estadísticamente significativos, y supondría un incremento de los costes de producción.

Por todo lo dicho hasta aquí, a partir de este punto hemos centrado nuestro estudio en la producción y tratamiento de champiñones crecidos en MSmd/Compost suplementados al 5% con HTCH o HHO, indistintamente.

Tabla-R.5. Crecimiento (biomasa, Kg/m²) y contenido de ergosterol de *A. bisporus* crecido en diferentes medios sólidos mínimos definidos/Compost (MSmd/Compost) suplementados con diferentes suplementos, 50 g/Kg.

Medio de cultivo	Productividad (Kg/m ²)	Ergosterol (mg/g, p.s.)	N
Compost	8,40±1,92	4,26±0,31	4
Compost+HALP/Inoc	11,62±1,67	5,21±0,59	4
Compost+HALP/TC	11,34±2,07	5,23±0,72	4
Compost+HHO/Inoc	13,25±1,83 **	5,62±0,62 *	4
Compost+HHO/TC	12,97±2,34 **	5,64±0,76 *	4
Compost+HTCH/Inoc	14,40±0,93 **	5,72±0,55 *	4
Compost+HTCH/TC	13,80±1,62 **	5,68±0,42 *	4

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Tabla-R.6. Productividad (biomasa, Kg/m²) y contenido de ergosterol de *A. bisporus* crecido en diferentes medios sólidos mínimos definidos/Compost (MSmd/Compost) suplementados con diferentes suplementos, 100 g/Kg.

Medio de cultivo	Productividad (Kg/m ²)	Ergosterol (mg/g, p.s.)	N
Compost	8,63±2,09	4,18±0,41	4
Compost+ HALP/Inoc	12,11±1,45	5,28±0,63	3
Compost+ HALP/TC	11,97±1,87	5,31±0,34	3
Compost+ HHO/Inoc	14,05±3,02 *	5,55±0,93	3
Compost+ HHO/TC	13,27±1,94 *	5,72±0,66*	3
Compost+ HTCH/Inoc	14,86±1,56 **	5,83±0,81*	4
Compost+ HTCH/TC	14,21±2,11 *	5,97±1,04*	4

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

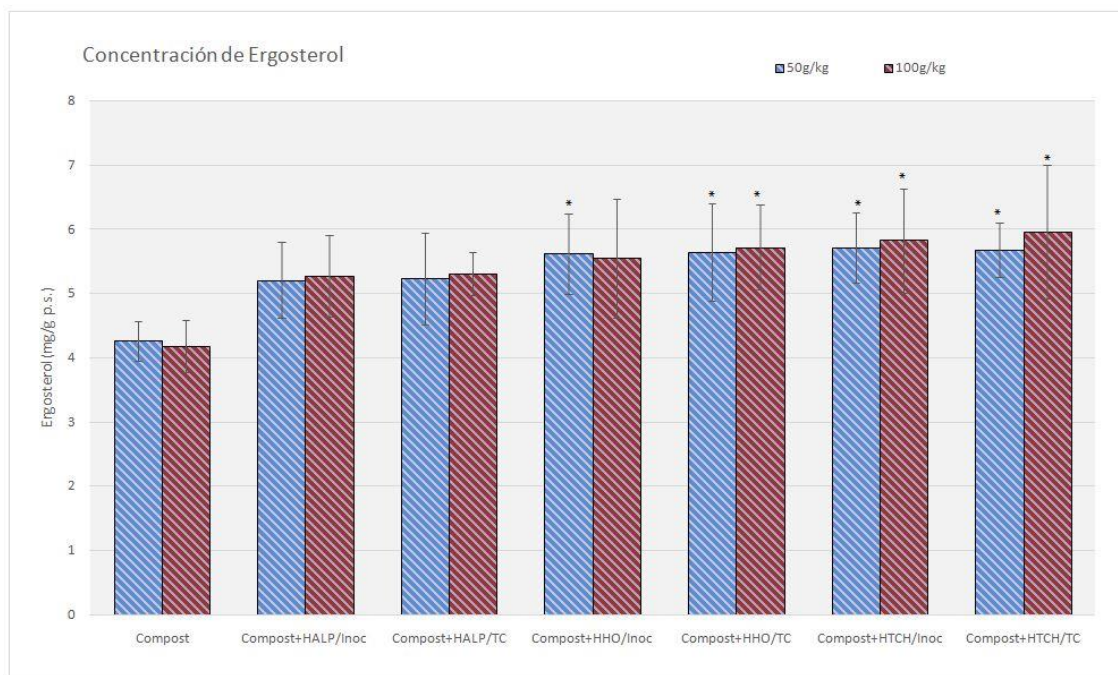


Figura R.8 – Concentración de ergosterol obtenida del compost mínimo con los inductores ensayados a concentraciones de 50g/kg y 100g/kg.

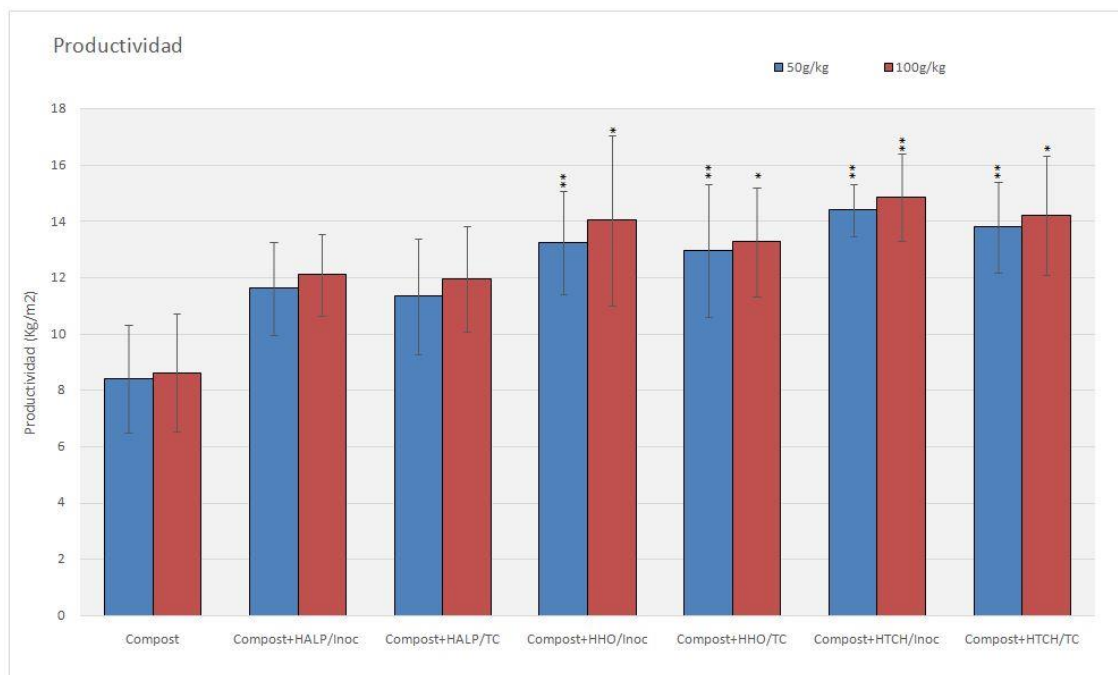


Figura R.9– Productividad del compost mínimo con los inductores ensayados a concentraciones de 50g/kg y 100g/kg.

En este punto nos planteamos la pregunta: ¿cómo se comportaría *A. bisporus*, frente a la suplementación, si el compost utilizado fuera un compost rico, como el utilizado por alguna de las principales empresa dedicadas a la producción de champiñones, que utilizan composts optimizados, el Grupo Riberebro (Haro, La Rioja), por ejemplo?

Estos estudios, por temas logísticos y de seguridad industrial se llevarón a cabo en el Centro Tecnológico Agroalimentario La Rioja (CTIC-CITA) (Alonso, La Rioja), suplementando el compost industrial utilizado por el Grupo Riberebro con HHO y HTCH. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla-R.7.

Tabla-R.7. Productividad (biomasa, Kg/m²) y contenido de ergosterol de *A. bisporus* crecido en compost industrial suplementados con diferentes suplementos, 100 g/Kg tierra de cobertura.

Medio de cultivo	Productividad (Kg/m ²)	Ergosterol (mg/g, p.s.)	N
Compost industrial	14,76±1,34	5,33±0,43	3
Compost+ HHO	17,43±1,22 *	5,15±0,86	3
Compost+ HTCH	18,34±1,03**	5,93±0,71	3

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Como puede observarse, en relación con el contenido en ergosterol prácticamente no se observa mejora alguna, probablemente debido a la optimización del compost industrial a lo largo de los años; mientras que en relación con la productividad sí se observa una ligera mejora o tendencia a una productividad más alta.

Independientemente de la concentración de ergosterol en *A. bisporus*, crecido en el compost industrial o mínimo suplementado, esta es suficientemente elevada, 5,93±0,71 y 5,97±1,04 mg/g p.s., respectivamente, como para poder obtener por irradiación/tratamiento con luz-UV niveles de vitamina D2 suficientes ([Kalaras y col., 2012a](#)) como para lograr que el champiñón enriquecido en Vitamina D2 sea considerado como un alimento funcional por sí mismo. Permitiendo de esta manera aportar en una comida (80-100 gr p.h. de champiñones) la cantidad suficiente de

vitamina D2 para cubrir prácticamente la dosis diaria (400UI o 15 µg), como discutiremos más abajo.

Pero previamente, detengámonos en analizar la composición de los champiñones crecidos en compost de composición mínima y suplementado con HTCH o HHO.

4.3. COMPOSICIÓN QUÍMICO-NUTRICIONAL DE CHAMPIÑONES CRECIDOS EN MSmd/COMPOST SUPLEMENTADO CON HTCH O HHO

Como muestran los resultados presentados en las Tabla R.8 la composición químico nutricional de los champiñones cultivados en MSmd/Compost suplementado con HTCH o HHO es prácticamente equivalente entre sí y con los champiñones obtenidos en un compost industrial proporcionado por el grupo Riberebro (Haro, La Rioja) y utilizado como control. Detengámonos un poco en la composición de los champiñones obtenidos en compost suplementado con HTCH o con HHO.

Como se muestra en la Tabla R.8, el contenido en agua, o humedad, tanto del champiñón crecido en compost industrial (control) como en composts suplementados, es prácticamente igual: $91,1 \pm 0,5$, $91,2 \pm 0,5$ y $91,4 \pm 0,3$, respectivamente.

En cuanto al restante contenido, los carbohidratos constituye la fracción mayoritaria en la composición del champiñón: $56,5 \pm 2,1$ en el compost industrial y $58,3 \pm 1,8$ y $58,1 \pm 3,1$ en el compost suplementado con HTCH y HHO, respectivamente. Valores estadísticamente no significativos pero con una clara tendencia al alza en los composts suplementados. Dentro de este grupo de biomoléculas incluimos: monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos fácilmente hidrolizables (PSFH) y polisacáridos difícilmente hidrolizables (PSDH). Como podemos ver de los resultados expuestos en la Tabla- R.8, entre los polisacáridos predominan los PSFH (65,5, 64,7 y 64,5% del total de polisacáridos, en los champiñones crecidos en el compost industrial y suplementado con HTCH o HHO, respectivamente); estando el resto constituido por PSDH, quitina y glucanos fundamentalmente. En cuanto a los monosacáridos constituyentes de estos polisacáridos, la glucosa es el principal monosacárido, si bien también son detectables: galactosa, manosa, fucosa y xilosa (ver Tabla-R9).

Tabla-R.8. Composición químico-nutricional de champiñones cultivados en MSmd/Compost suplementado con HTCH o HHO al 5%. (Datos expresados en %).

	Compost industrial (Control)	Compost + 5% HTCH	Compost + 5% HHO
Humedad (% , p.h)	91,1±0,5	91,2±0,5	91,4±0,3
Peso seco (% , p.h)	8,9±0,5	8,8±0,5	8,6±0,3
Cenizas	8,9±0,5	9,1±0,4	9,0±0,3
Materia orgánica	91,1±0,5	90,9±0,4	91,0±0,3
Hidratos de carbono ^{totales}	56,5±2,1	58,3±1,8	58,1±3,1
Mono y Oligosacáridos	1,2±0,2	1,4±0,2	1,7±0,4 *
Manitol	30,4±1,9	31,0±1,5	30,9±2,7
Polisacáridos	20,9±1,1	22,1±2,2	22,8±1,9
PSFH	13,7±0,4	14,3±0,3	14,7±0,5*
PSDH:	7,2±0,2	6,4±0,3**	6,2±0,3**
Quitina	4,0±0,1	4,1±0,1	4,1±0,1
Glucanos	3,2±0,2	3,5±0,4	3,3±0,2
N _t	5,17±0,3	5,44±0,3	5,34±0,3
N _{no-proteico}	2,1±0,3	2,0±0,4	2,0±0,2
Proteína	19,2±1,3	21,5±0,7 *	20,8±1,3
Grasa	3,3±0,3	3,3±0,2	3,8±0,4
Fenoles ^{totales} (mg/g p.s.)	8,3±0,4	9,4±0,3 **	9,7±0,4 **
Melaninas	6,4±0,4	5,1±0,2 ***	4,9±0,3 ***
Ergosterol (mg/g p.s.)	4,2±0,4	5,7±0,3 ***	5,3±0,4 **

PSFH: polisacáridos fácilmente hidrolizables; PSDH: polisacáridos difícilmente hidrolizables * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Tabla-R.9. Principales monosacáridos integrantes de los polisacáridos de *Agaricus bisporus* crecidos/cultivados en MSmd/Compost suplementado con HTCH o HHO al 5%. (% del total de monosacáridos)

	Compost (control)	Compost + 5% HTCH	Compost + 5% HHO
Glucosa	79,5±2,1	80,3±1,8	79,9±2,2
Galactosa	4,6±0,2	4,7±0,2	4,8±0,1
Manosa	3,7±0,3	3,6±0,2	3,7±0,2
Xylosa	5,1±0,2	5,1±0,3	5,0±0,2
Fucosa	6,6±0,4	6,1±0,2	6,2±0,3
Otros	0,5±0,1	0,2±0,1**	0,4±0,1

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

En relación con los PSDH únicamente son identificables glucosa y glucosamina, lo que sugiere que estos polisacáridos difícilmente hidrolizables están constituidos por glucanos y quitina, representando la quitina el 55,5, 64,1 y 66,1% del total de PSDH en los champiñones crecidos en el compost industrial y suplementado con HTCH o HHO, respectivamente; el resto estaría constituido por los glucanos.

Otro azúcar interesante en los hongos es el disacárido trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1-1) α -D-glucopiranósido) que en *A. bisporus* no se encuentra a altos niveles como sí ocurre en otros hongos comestibles, como p. ej., en *Pleurotus ostreatus*, donde se cree que desempeña funciones de reserva (**Morton, 1985**). Sin embargo, en *A. bisporus* las funciones de reserva las desempeña fundamentalmente el polialcohol manitol ((2R, 3R, 4R, 5R)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol) que sí se encuentra a altas concentraciones ($30,4 \pm 1,9$, $31,0 \pm 1,5$ y $30,9 \pm 2,7$ %, p.s., en los champiñones crecidos en el compost industrial y suplementado con HTCH o HHO, respectivamente) (**Stoop y col., 1996**).

Cuantitativamente, el otro grupo importante de biomoléculas, en *A. bisporus*, lo constituyen las proteínas, que en *A. bisporus* es del orden del 20% ($19,2 \pm 1,3$; $21,5 \pm 0,7$ y $20,8 \pm 1,3$ % en compost industrial (control), en compost suplementado con HTCH y en compost suplementado con HHO, respectivamente). La mayor parte de estas proteínas están unidas a carbohidratos (**García-Mendoza, 2000**), por lo que su biodisponibilidad, desde un punto de vista nutricional, es relativamente baja, siendo necesaria su hidrólisis previa para aumentar la biodisponibilidad.

En cuanto a la composición aminoacídica de las proteínas de *A. bisporus*, en la Tabla-R.10 se muestra el contenido aminoacídico de las proteínas de champiñones obtenidos en compost industrial, en compost suplementado con HTCH y en compost suplementado con HHO. Como puede observarse prácticamente todos los aminoácidos están presentes. El aminoácido más abundante, en todos los casos, es el ácido glutámico, realmente la suma de ácido glutámico más glutamina, ya que al hidrolizar las proteínas con HCl 6 N a 120°C toda la glutamina se transforma en ácido glutámico más amoníaco, que desempeña un importante papel en el metabolismo.

Estos resultados, tanto para el champiñón industrial como para los obtenidos en compost suplementado con HTCH o HHO, son semejantes a los obtenidos por otros autores ([Jaworska y Bernas, 2011b](#)).

En lo referente al valor nutricional de un alimento cuando nos referimos al valor proteico éste se encuentra vinculado a la proporción de aminoácidos esenciales. La FAO/WHO recomienda unos perfiles aminoacídicos ideales en la ingesta proteica para conseguir el mantenimiento en la tasa de recambio metabólica (Ver Tabla-R.10) ([FAO/WHO, 2013](#)).

Los aminoácidos esenciales (AAEs) representan entre el 40,61 – 42,03% del total de aminoácidos presentes. La FAO considera que los valores de mantenimiento metabólico pueden satisfacerse con porcentajes de 27,7% para adultos y 29,06% para niños entre 3 y 14 años. Como se puede apreciar de los resultados expuestos en la Tabla R9 todos los aminoácidos considerados esenciales por la FAO se encuentran en una proporción superior a la recomendada en el champiñón, tanto individualmente, como en conjunto ([FAO/WHO, 2013](#)). Además en los valores obtenidos para los champiñones crecidos en el compost suplementado con HTCH o HHO (41,5% y 42,03% respectivamente) se aprecian proporciones superiores a las obtenidas en el compost industrial (40,61%). Es destacable mencionar que la proporción de aminoácidos aromáticos disminuye en los champiñones obtenidos en compost suplementados con HTCH (6,89) o HHO (6,67) respecto al compost industrial (8,94), lo que es importante tener en cuenta ya que ciertas patologías, fundamentalmente hepáticas, se ven afectadas por un desequilibrio de estos aminoácidos ([Bautista y col., 2000](#)). La Razón de Fischer o relación entre el contenido en aminoácidos ramificados y aminoácidos aromáticos, es de especial importancia en enfermedades hepáticas en las que se desarrolla un desequilibrio al disminuir la concentración de los aminoácidos ramificados y aumentar la de los aromáticos, que ser transportados por el mismo transportador en el cerebro, favorece la formación de falsos neurotransmisores. Por lo que este desequilibrio, a favor de los aminoácidos aromáticos, empeora la condición de pacientes con cirrosis, encefalopatía hepática, o carcinoma hepatocelular, pero la administración de suplementos ricos en aminoácidos ramificados es capaz de ralentizar el desarrollo de las enfermedades y generar una mejora de la calidad de vida ([Fischer, 1974; Tajiri y Shimizu, 2013](#)).

Tabla-R10. Composición aminoacídica (g/100 g proteins) de las proteínas de champiñones crecidos en compost suplementado con HTCH o HHO al 0,5%

	Champi.industriales	Champi.HTCH	Champi.HHO	FAO/WHO	
				3-14	+18
Ala	5,71±0,12	7,64±0,16***	6,93±0,19***		
Arg	4,92±0,12	4,59±0,27	4,65±0,16		
Asx	11,80±0,72	10,32±0,96*	10,11±0,82*		
Cys*	1,71±0,06	1,31±0,11***	1,52±0,09*		
Glx	20,02±1,02	19,95±1,16	20,73±0,96		
Gly	5,11±0,42	5,05±0,68	5,16±0,73		
His*	2,58±0,12	2,69±0,26	2,53±0,19	1,6	1,5
Ile*	3,61±0,22	3,87±0,26	4,01±0,38	3,0	3,0
Leu*	7,02±0,42	7,56±0,91	8,06±0,87	6,1	5,9
Lys*	5,71±0,42	6,54±0,71	6,53±0,52	4,8	4,5
Met	1,41±0,08	1,99±0,17***	1,97±0,11***		
Phe*	4,24±0,22	3,65±0,27*	3,55±0,37*		
Pro	5,33±0,37	4,03±0,46**	4,25±0,36**		
Ser	5,81±0,24	5,43±0,57	5,29±0,48		
Thr*	4,86±0,32	5,63±0,37*	5,61±0,44*	2,5	2,3
Trp*	1,29±0,12	1,32±0,08	1,36±0,10	0,66	0,6
Tyr *	3,41±0,12	1,92±0,09***	1,76±0,23***		
Val*	4,78±0,32	5,02±0,36	5,13±0,48	4,0	3,9
AAsS*	3,12	3,30	3,49	2,3	2,2
AAsA*	8,94	6,89	6,67	4,1	3,8
ERG-SH	0,42±0,02 mg/g, p.s.	0,50±0,06 mg/g, p.s.	0,52±0,09 mg/g, p.s.		
AAsH	35,77	37,52	37,33		
AAsCP	13,21	13,82	13,71		
AAsCN	31,82	30,27	30,84		
AAsA	8,94	6,89	6,67		
AAsR	15,41	16,45	17,20		
AAEs	40,61	41,50	42,03	29,06	27,7
[AAsR] [AAsA]	1,72	2,38	2,58		

AAsS: aminoácidos azufrados (Cys+Met)

AAsH: aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp,)

AAsCP: aminoácidos con carga positiva (Arg, Lys, His)

AAsCN: aminoácidos con carga negativa (Asx+Glx; Asx =Asp + Asn; Gln= Glu + Gln)

AAsA: aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe, Trp)

AAsR: aminoácidos ramificados (Leu, Ile y Val)

AAEs: *aminoácidos esenciales

FAO/WHO Patrones recomendados para el mantenimiento aminoacídico para niños de 3-14 años y para adultos (+18).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Por todo ellos la disponibilidad de fuentes proteicas con una razón de Fischer alta, es decir, con mayor concentración de aminoácidos ramificados que de aminoácidos aromáticos, son muy deseables para el tratamiento de enfermedades hepáticas

Los champiñones crecidos en compost industrial presentan una razón de Fischer de 1,72 por lo que podrían considerarse un alimento apropiado para pacientes de riesgo de padecer el déficit característico de estas enfermedades. Además, en los champiñones crecidos en compost suplementados con HTCH y HHO se aprecia una disminución del contenido en los aminoácidos aromáticos y un aumento de los ramificados, lo que aumenta la razón de Fische a 2,38 y 2,58 respectivamente. Por ello los champiñones crecidos en compost mínimo y suplementado con HTCH o HHO podrían emplearse como un complemento en los tratamientos de las enfermedades hepáticas.

Los aminoácidos cargados negativamente suponen una gran parte del total de aminoácidos. Pese a que la representación incluye de forma conjunta Asn y Asp y Glu y Gln, estos son los aminoácidos más abundantes individualmente. El ácido glutámico es un saborizante empleado en la industria alimentaria al ser uno de los principales responsables del sabor *umami*. Su elevada concentración como aminoácidos libres supone una parte importante del sabor característico de los hongos y setas comestibles. Al presentar carga negativa a pH fisiológico estos aminoácidos pueden actuar como quelante de iones metálicos (Lumb y Martell, 1953). Puesto que ciertos iones libres (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} o Cu^{3+}) pueden catalizar reacciones de oxidación no enzimática produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS) como H_2O_2 , el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) o el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Oliveira y col., 2011), la acción de estos aminoácidos como quelante de iones metálicos puede prevenir los fenómenos mediados por el estrés oxidativo (Imer y col., 2008) y por tanto beneficiar la salud.

Aunque no es propiamente un aminoácido, sino un derivado aminoacídico de la histidina, la ergotioneina (2-mercaptohistidine trimethylbetaine) posee una elevada capacidad antioxidante (Halliwell y col., 2018). La presencia de transportadores específicos de ergotioneina en determinados tejidos (Gründermann y col., 2005) hace suponer que presenta una actividad biológica importante, protegiendo contra el estrés oxidativo en las mitocondrias, especialmente en los glóbulos rojos, hígado, riñones y en el semen donde se puede apreciar una concentración fisiológica superior (Kalaras y col., 2017; Tang y col., 2018).

Los valores de Ergotioneina (ERG-SH) para los champiñones crecidos en compost suplementado con HTCH o HHO ($0,50\pm0,06$ y $0,52\pm0,09$ mg/g, p.s., respectivamente) son ligeramente superiores a los obtenidos en el compost industrial ($0,42\pm0,02$ mg/g, p.s.) y a los mencionados en la bibliografía ($0,41\pm0,18$ mg/g, p.s.) ([Kalaras y col., 2017](#)). Pese a que los valores no son excesivamente altos, comparado con otras fuentes, está aceptado que los hongos comestibles son una de las mejores fuentes para obtener ergotioneina, por lo que un incremento respecto a los niveles basales en la producción industrial puede ser un factor a tener en consideración a la hora de preparar nutraceutico enriquecidos en este antioxidante, potencialmente utilizable en el tratamiento de enfermedades crónicas que cursan con un elevado estrés oxidativo ([Cheah y Halliwell, 2012](#); [Cremades y col., 2015](#)). Aunque aún no se ha establecido una dosis diaria recomendada para la ergotioneina distintos autores le atribuyen una importancia similar a la del glutatión, discutiendose en determinadas ocasiones si debería considerarse una vitamina. Al estar considerada un compuesto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos, su aplicación como nutracéuticos está aceptada y es posible encontrar suplementos comercializados que contienen este antioxidante.

El contenido en lípidos de los hongos comestibles es bajo, del orden del 3% (3,3, 3,3 y 3,8% en champiñones cultivados en compost industrial, suplementado con HTCH y suplementado con HHO, respectivamente) (Tabla-R.8), y conjuntamente con el alto contenido en agua, es la principal causa de su bajo contenido calórico, de donde se desprende su importancia en el uso contra la obesidad, como alimento hipocalórico de gran capacidad saciante. En cuanto a los integrantes de los lípidos del champiñón, el 82,8% de ellos está constituido por ácidos grasos, siendo su contenido en ácidos grasos insaturados similar al del aceite de oliva ([FAO/WHO, 2010](#)). En la Tabla-R.10 se muestran los principales ácidos grasos encontrados en champiñones crecidos en compost industrial y en compost suplementado con HTCH o HHO.

De entre los ácidos grasos, son de un gran interés nutricional los ácidos grasos esenciales, sobre todo los correspondientes a las series ω -3 (derivadas del ácido linolénico) y ω -6 (derivadas del ácido linoleico). Su importancia no sólo radica en que son elementos esenciales en la dieta, sino que además actúan como cardioprotectores al

retrasar la aterogénesis disminuyendo el riesgo de infartos e ictus (Nestel, 2000; Tortosa-Caparrós, 2017).

Tabla-R11. Principales ácidos grasos integrantes de los lípidos de *Agaricus bisporus* crecidos/cultivados en Compost sin suplementar y suplementado con HTCH o HHO al 5%. (Los resultados se han expresado como % del total de ácidos grasos).

	Compost (control)	Compost + 5% HTCH	Compost + 5% HHO
Mirístico (C14:0)	0,41±0,03	0,23±0,02***	0,45±0,02
Pentadecanoico (C15:0)	1,12±0,09	1,24±0,11	1,36±0,11*
Palmítico (C16:0)	8,71±0,41	8,23±0,23	8,52±0,38
Estearico (C18:0)	5,83±0,31	5,16±0,43	4,78±0,34**
AGs-saturado	16,07	14,86	15,11
Oleico (C18:1)	54,72±3,22	55,93±4,14	55,61±3,17
Linoleico (C18:2)	24,06±1,76	25,08±2,07	25,13±1,47
Linolenico (C18:3)	4,94±0,23	4,07±0,17***	4,11±0,22***
AGs-insaturados	83,72	85,08	84,85
Razon Linoleico/Linolenico	4,87	6,16	6,11

El ácido oleico es el ácido graso más abundante en *A. bisporus* (54,8 a 56,3%), seguido del ácido linoleico, ambos ácidos grasos esenciales, y de gran importancia desde el punto de vista metabólico y nutritivo, ya que están implicados en la biosíntesis de las membranas celulares, prostaglandinas y en la regulación del metabolismo (FAO/WHO, 2010; Simopoulos, 2002).

En cuanto al contenido en ácidos grasos saturados e insaturados, el contenido en saturados varía entre el 16,1% del compost industrial y el 15,8 y 15,1% del compost suplementado con HTCH o HHO, respectivamente. El contenido en ácidos grasos insaturados varía entre el 83,9% del compost industrial y el 84,2 y 85,2 del suplementado con HTCH o HHO, respectivamente.

La proporción de ácidos grasos ω -6 respecto a ω -3 en las dietas occidentales encuentra desproporcionada, siendo frecuentes relaciones 15:1 o 16,7:1. Estas proporciones favorecen la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, cáncer, y enfermedades inflamatorias y autoinmunes y sus efectos disminuyen cuando se incrementa la ingesta de ω -3 (Simopoulos, 2004).

La razón [ácido linoleico] / [ácido linolénico] es de 4,8 en los champiñones crecidos en compost industrial, y de 6,1 y 6,4 en el compost suplementado con HTCH o HHO, respectivamente, próxima a la recomendada por la FAO/WHO (2010). Esto nos permite contemplar a los champiñones como un alimento adecuado para personas mayores y enfermos cardiovasculares.

Los compuestos fenólicos encontrados en *A. bisporus* comprenden tanto compuestos de bajo peso molecular como de alto peso molecular (melaninas). Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular están constituidos mayoritariamente por: ácido cinámico, p-hidroxibenzoico, cafeico etc., y su contenido se expresa de manera general bajo el término de polifenoles totales. Estos compuestos suelen presentar propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Jong y Birmingham, 1993; Soler-Rivas y col., 1999; Mattila y col., 2001). En champiñones crecidos en compost industrial y compost suplementado con HTCH y HHO el contenido en polifenoles totales es de $8,3\pm0,4$, $9,4\pm0,3$ y $9,7\pm0,4$ %, respectivamente (ver Tabla-R.8), lo que supone un incremento estadísticamente significativo en el caso del compost suplementado con HTCH o HHO.

Las melaninas son moléculas con alto peso molecular, muy estables, amorfas, cargadas negativamente, resistentes a la degradación con ácidos pero degradables con bases fuertes, hidrofóbicas, insolubles en agua o solventes orgánicos, las cuales son formadas por la polimerización oxidativa de compuesto fenólicos o indólicos. En champiñones crecidos en compost industrial y compost suplementado con HTCH y HHO el contenido en melaninas es de $6,4\pm0,4$, $5,1\pm0,2$ y $4,9\pm0,3$ %, respectivamente apreciándose una disminución estadísticamente significativa en los compost suplementados (ver Tabla-R.8).

El incremento de polifenoles totales y la disminución de la concentración de melaninas parece indicar que se favorece la presencia de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular con las capacidades antioxidantes y antimicrobianas mencionadas previamente.

En cuanto al contenido en ergosterol en champiñones crecidos en compost industrial y compost suplementado con HTCH y HHO éste es de $4,2\pm0,4$, $5,7\pm0,3$, y $5,3\pm0,4$, respectivamente. Como podemos observar la concentración de ergosterol en los

compost suplementados presenta valores mayores, estadísticamente significativa, que el valor encontrado en el compost industrial (control), así como en el compost de composición mínima (sin suplementar), $4,08 \pm 0,3$ (Bautista, 2017), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Lo que nos estaría indicando que la suplementación, no sólo sería buena para aumentar la productividad, sino que además también lo sería cuando el fin fuera obtener ergosterol para su uso como nutracéutico o para su fotoconversión en vitamina-D2 por radiación con luz-UVB. En este último caso, podríamos obtener champiñones enriquecidos en vitamina-D2, capaces de suministrar suficiente vitamina-D2 como para cubrir la dosis recomendable diaria (15 µg) (Pludowski y col., 2016) consumiendo una ración de champiñón (80 – 100 g, p.h.). El producto así obtenido constituiría por sí mismo un alimento funcional, actualmente aceptado en el mercado por las autoridades competentes (EFSA), como más adelante comentaremos. Si bien, cuando los experimentos se han realizado en planta semi-industrial la suplementación del compost industrial con HTCH o HHO no ha proporcionado mayores concentraciones de ergosterol en el caso de la suplementación, aunque sí se ha observado un ligero incremento, aunque no estadísticamente significativo, en la productividad. Probablemente debido a que el compost industrial es un compost optimizado a lo largo de años.

4.4. SOBRE-EXPRESIÓN DE ENZIMAS CLAVES DE LA VÍA BIOSINTÉTICA DEL ERGOSTEROL EN HONGOS

Aunque una razón óptima C/N podría explicar/justificar la mayor producción de biomasa (Pardo-Gimenez y col., 2012), el incremento en el contenido en ergosterol tanto en el micelio como en los cuerpos fructíferos, necesita de alguna justificación adicional, a ser posible a nivel molecular. Por ello decidimos estudiar la expresión de algunas enzimas claves de la vía de biosíntesis del ergosterol (Hu y col., 2017) (Figura-R.10) mediante Western-blot ya que disponíamos de anticuerpos y además la cuantificación directa de la cantidad de proteína mediante esta técnica nos parece más adecuada que la PCR ya que la correlación mRNA proteína no siempre se aproxima a 1 (Anderson y Seilhamer, 1997; Gygi y col., 1999). Si bien no se discute el gran valor de las técnicas de PCR, el dato de Western-blot nos pareció más próximo a la realidad ya que mide la cantidad real de proteína/enzima funcional. Por lo que se procedió al estudio de la expresión de las cuatro siguientes enzimas claves de la vía biosintética de

ergosterol en hongos (ver Figura-R.10): ERG2, ERG4, ERG6 y ERG11 mediante western-blot. Debido a la dificultad para purificar estas enzimas, para la obtención de los correspondientes anticuerpos, se ha recurrido a la obtención de estos a partir de péptidos sintéticos, específicos y de alta inmunogenicidad para cada una de las enzimas (Araujo y col., 1996).

Con el objetivo de localizar secuencias candidatas para producir péptidos sintéticos, se realizó un modelado *in silico* a partir de las bases de datos de la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (KEGG) (disponibles en www.kegg.jp) y el programa de modelado por homología de Swiss-model ExPASy (disponible en Swissmodel.expasy.org). Para ello se compararon las secuencias de *Agaricus bisporus* para las enzimas de interés, respecto a modelos de proteínas de diferentes organismos buscando una representación gráfica con buena homología de secuencia. Las secuencias con mayor probabilidad inmunogénica se encontrarían en regiones de superficie o en los extremos más expuestos N- y C-terminal. En relación con los extremos terminales, el extremo N-terminal suele estar modificado al incluir secuencias de aminoácidos que sirven de señal para la correcta ubicación intracelular durante el procesamiento, por lo que un buen criterio de selección de secuencias inmunogénicas suele ser la región del extremo C-terminal; y este ha sido el criterio que hemos seguido en nuestro estudio.

Para la enzima ERG 11 (Figura-R.11), presunta citocromo P450 lanosterol C-14 α -demetilasa que cataliza la reacción del lanosterol a 4,4-dimethyl-cholesta-8,14,24-trienol, se comparó la secuencia AGABI2DRAFT_191124 de *A. bisporus* var *bisporus* H97 frente al molde 5eah.1.A de *S. cerevisiae* con un 45% de homología.

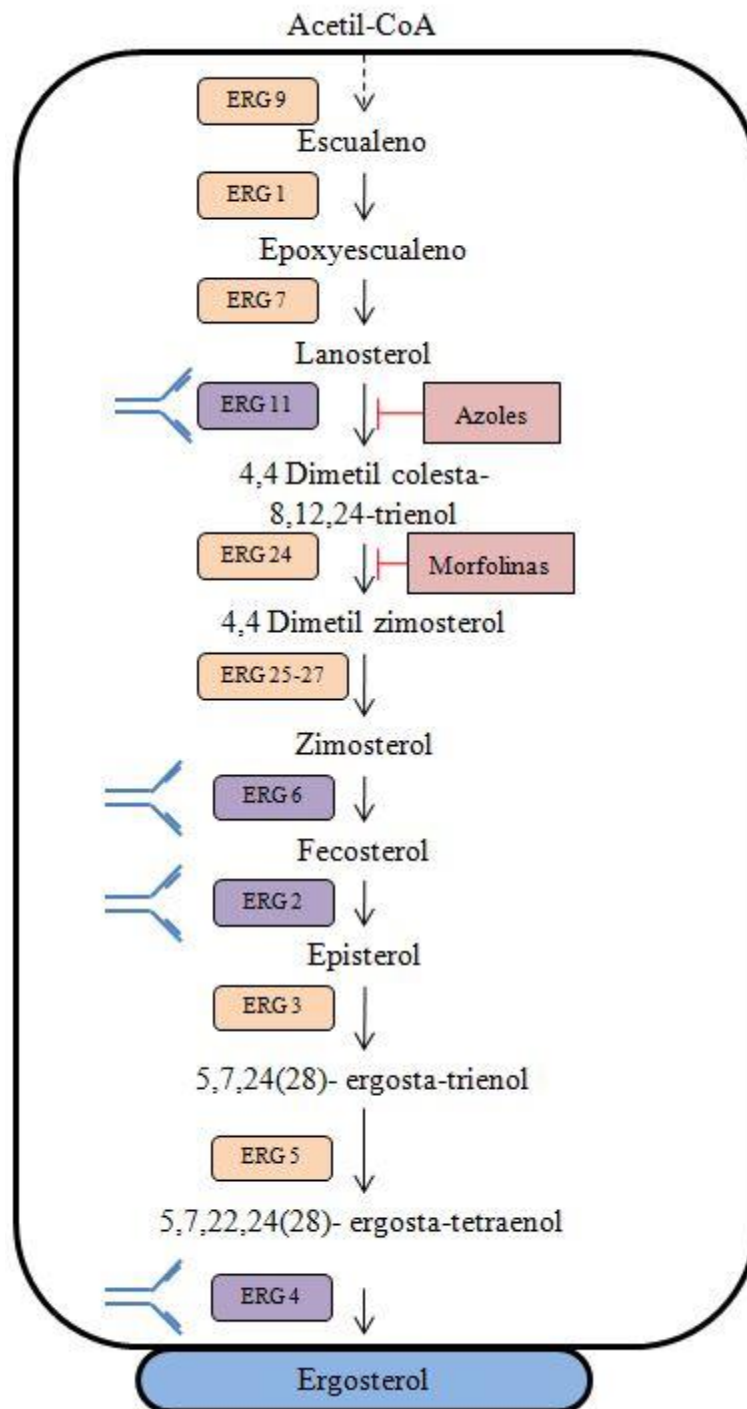


Figura-R.10. Principales enzimas implicadas en la biosíntesis del ergosterol en hongos.

(ERG1 – squalene epoxidase; ERG2 – sterol C-8 isomerase; ERG3 – sterol C-5 desaturase; ERG4 – sterol C-24 reductase; ERG5 – sterol C-22 desaturase; ERG6 – sterol C-24 methyltransferase; ERG7 – lanosterol synthase; ERG11 (CYP51) – lanosterol C-14 demethylase; ERG24 – sterol C-14 reductase; ERG25 – sterol C-4 methyl oxidase; ERG26 – sterol C-3 dehydrogenase (C4-decarboxylase); ERG27 – sterol C-3 ketoreductase).

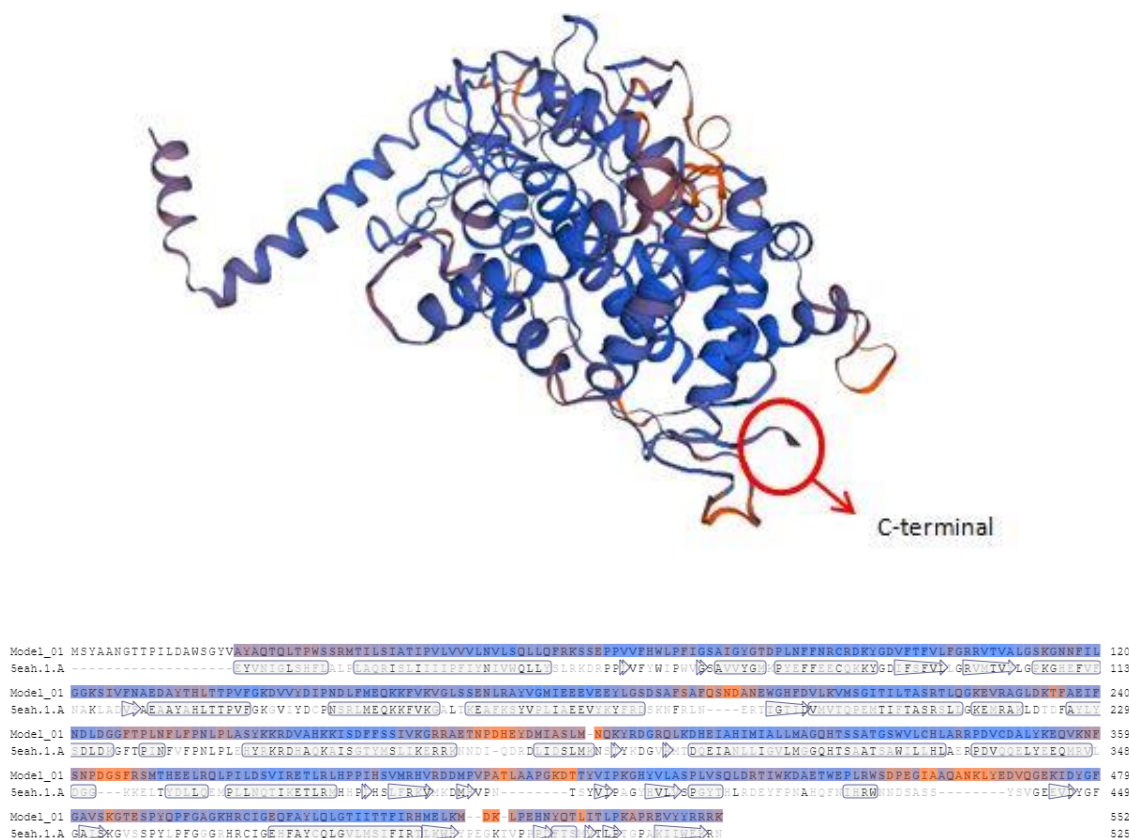


Figura-R.11. Estructura terciaria propuesta para ERG 11 por homología de la secuencia AGABI2DRAFT_191124 de *A. bisporus* y el molde 5eah.1.A de *S. cerevisiae*.

La comparativa da un elevado grado de conservación de estructura y el extremo C-terminal queda expuesto en el modelo en la superficie siendo un buen candidato para la elección del péptido sintético.

Para la enzima ERG 6 (Figura-R.12), o C-24 sterol methyltransferasa que cataliza la reacción zymosterol a fecosterol, se enfrentaron la secuencia AGABI2DRAFT_194260 de *A. bisporus* var bisporus H97 frente al molde 3bus.1.A, una methyltransferasa de oligosacaridos con una homologia del 26,79%.

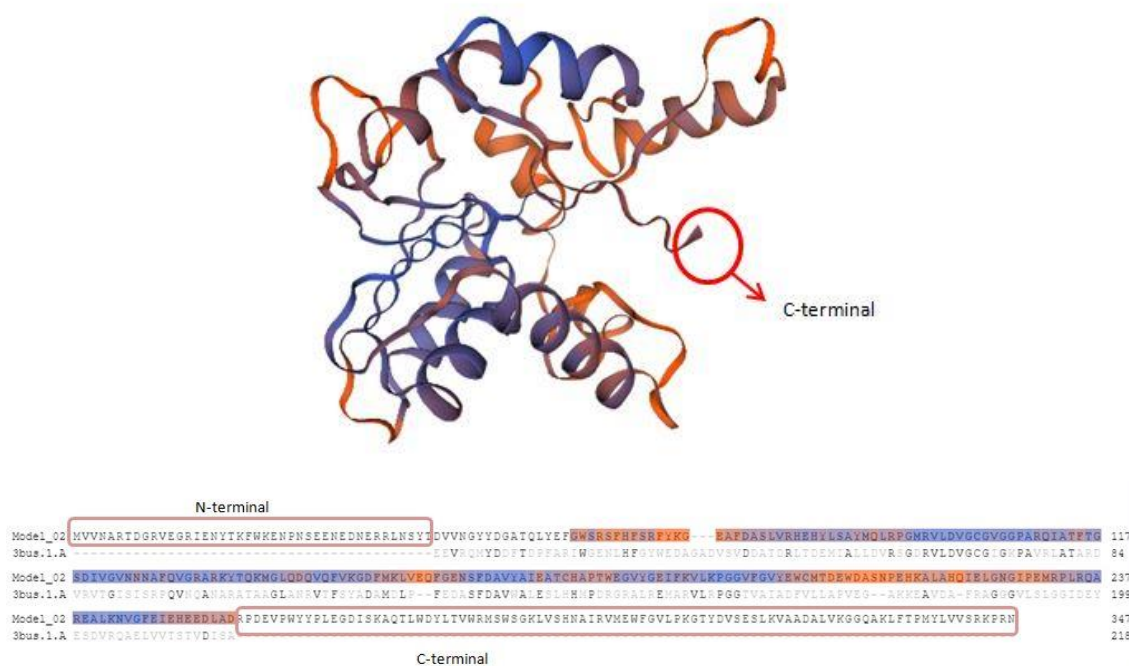


Figura-R.12. Estructura terciaria propuesta para ERG6 por homología de secuencia AGABI2DRAFT_194260 de *A. bisporus* y el molde 3bus.1.A.

En este caso la secuencia muestra regiones considerables sin homologías en ambos extremos lo que podría indicar que la proteína sufre alguna modificación posttranscripcional. Tras la corrección realizada omitiendo los fragmentos genicos que no aparecen en el modelo, el extremo C terminal queda expuesto en superficie siendo esperable una buena respuesta inmunogenica.

Para la enzima ERG 2, esterol C-8 isomerasa que cataliza la reacción de fecosterol a episterol, se compararon la secuencia AGABI2DRAFT_135078 de *A. bisporus* var *bisporus* H97 frente al modelo que ofrecia mas homologia. En este caso, el molde de mayor homologia con un 30,43% era 5hk1.1.A, el receptor intracelular sigma no opioide en humanos. (Figura-R.13)

Además los demás modelos disponibles estaban mucho mas alejados de una homologia aceptable pero, este modelo presentaba conformacion de homotrimerico con el extremo C terminal expuesto en los vertices.

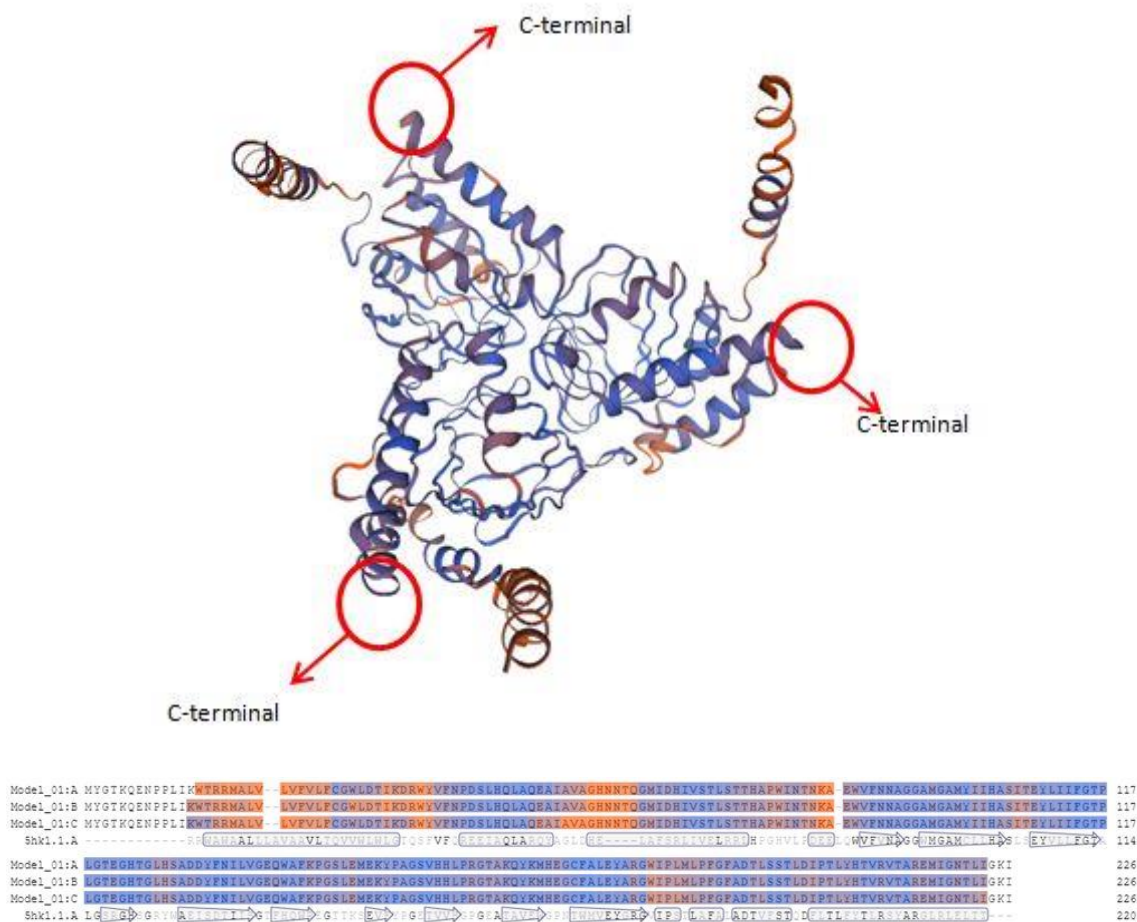


Figura-R.13. Estructura cuaternaria propuesta para ERG2 por homología de secuencia AGABI2DRAFT_135078 de *A. bisporus* y el molde 5hk1.1.A.

ERG 4, corresponderia a la enzima Delta24(24(1))esterol reductasa, que cataliza la reacción de 5,7,22,24(28)-ergotetraenol a ergosterol, siendo la ultima enzima implicada en la ruta. El modelo se generó desde la secuencia de AGABI2DRAFT_193266 de *A. bisporus* var *bisporus* H97 y se comparo con el molde de la estructura transmembrana de la esterol reductasa de *Methylomicrobium alcaliphilum*, 4.quv.1.A, con una homologia del 32% (Figura-R.14).

En el modelo generado el extremo C terminal aparece expuesto sin aparentes modificaciones postranscripcionales aunque el modelo empleado como homologo es una estructura transmembrana lo cual es posible que en este caso pueda presentarse parcialmente cubierto por la membrana

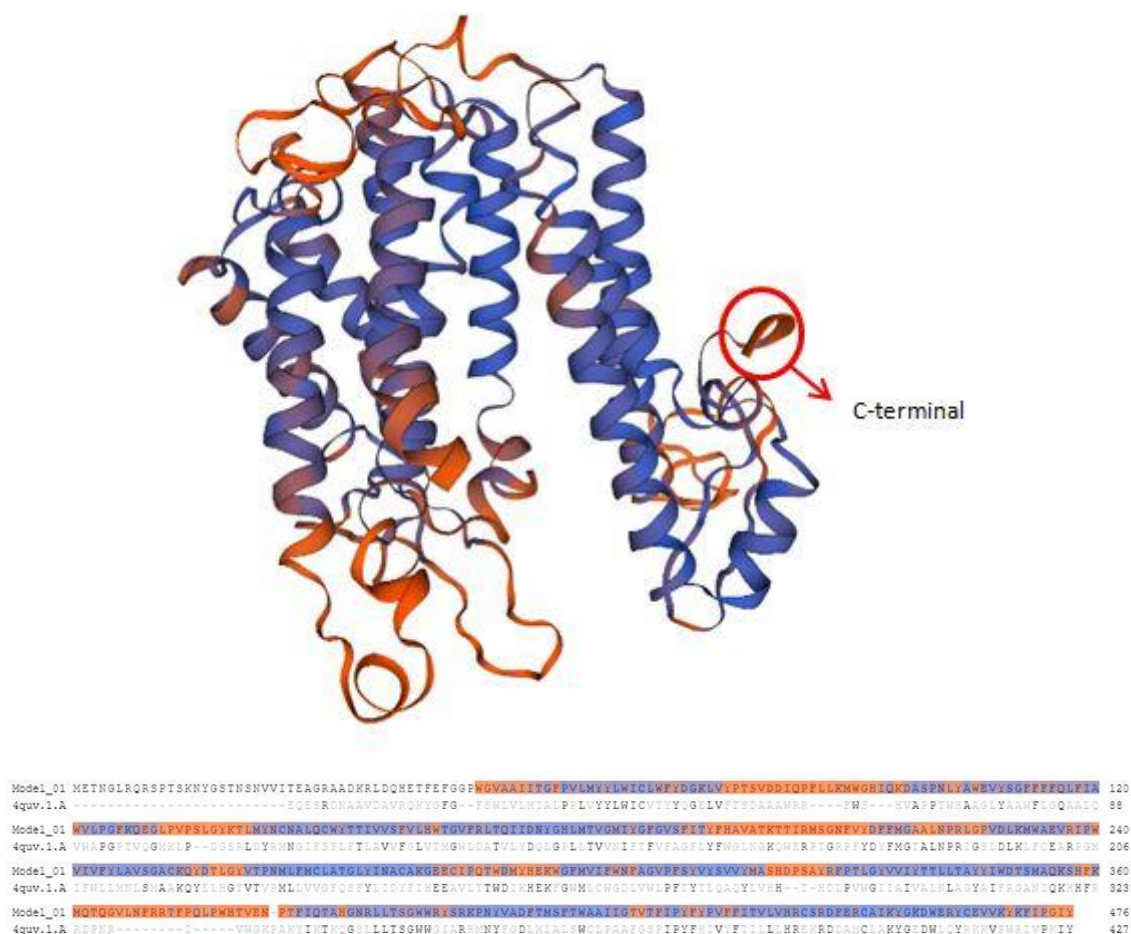


Figura-R14. Estructura terciaria propuesta para ERG4 por homología de secuencia AGABI2DRAFT_193266 de *A. bisporus* y el molde 4.quv.1.A de *Methylomicrobium alcaliphilum*

Como se muestra en la Figura-R.15 todos los anticuerpos reconocen a los péptidos sintéticos incluso a concentraciones de 5 ng. Sin embargo, cuando ensayamos los anticuerpos frente a las proteínas miceliales totales de *A. bisporus*, crecido en los diferentes medios, y separadas por PAGE-SDS y tras transferirse a membranas de PVDF, solo tres de ellos reconocen alguna proteína en el análisis por Western-blot: anti-ERG4, anti-ERG6 y antiERG11, como se muestra en la Figura-R.16. Esto, probablemente, sea debido a que los péptidos seleccionados estén localizados en la superficie, y/o extremos moleculares. Mientras que el péptido utilizado para obtener antiERG4 no haya sido el adecuado, a pesar de ser altamente inmunogénico, su localización no sea de fácil reconocimiento por el anticuerpo.

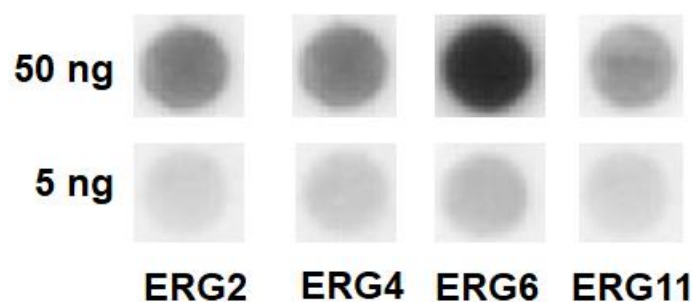


Figura-R.15. Análisis Dot usando 5 y 50 ng de péptidos sintéticos y su detección por sus respectivos anticuerpos (anti-ERG2, anti-ERG4, anti-ERG6 and anti-ERG11).

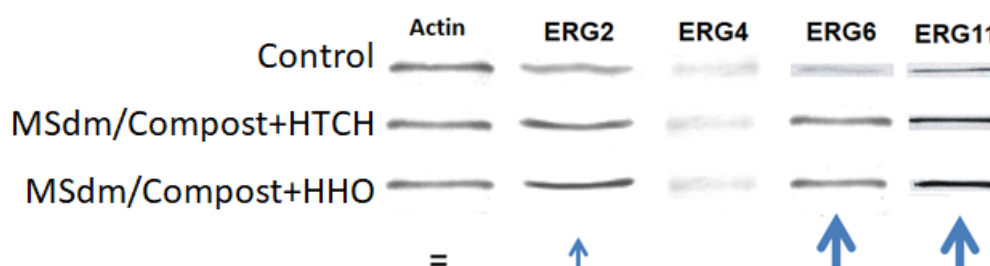


Figura-R.16 Analisis por Western-blot de las enzimas clave (ERG2, ERG4, ERG6 and ERG11) en la ruta biosintética del ergosterol en *A. bisporus*.

El análisis de imagen por Wester-blot también pone de manifiesto que las enzimas ERG6 (C-24 sterol methyltransferasa) y ERG11 (citocromo P450 lanosterol C-14 α -demetilasa) se expresan a mayor nivel que en el control (2,75 y 3,52 veces más, respectivamente) independientemente del suplemento utilizado; mientras que la enzima ERG2 (estrol C-8 isomerasa) presenta un incremento más bajo que las anteriores pero 1,85 veces mayor que el control. Resultados análogos se obtienen cuando se estudian las proteínas miceliales de *A. bisporus* crecido en MLdm y MSdm/Agar ([Falcón-García, 2018](#)).

A partir de estos resultados podemos concluir que al menos tres enzimas de la vía biosintética del ergosterol (ERG2, ERG6 y ERG11) son reguladas a la alta de manera significativa, indicando el papel estimulador de las sustancias presentes en los suplementos (HTCH y HHO), al menos cuando *A. bisporus* crece en un medio mínimo para la producción de ergosterol.

4.5. FOTOCONVERSIÓN DEL ERGOSTEROL EN VITAMINA-D2 POR IRRADIACIÓN-UV DE CHAMPIÑONES POST-COSECHA

En este apartado el objetivo ha sido estudiar las condiciones óptimas de irradiación del champiñón para conseguir los mayores niveles posibles de vitamina-D2. En estudios previos se ha visto que el contenido en ergosterol en los cuerpos fructíferos (champiñones) no es igual en todas sus partes (sombrero, laminillas o tallo). En la Tabla-R.12 se muestra el contenido en ergosterol para cada una de las principales partes del champiñón.

Tabla-R.12. Contenido en ergosterol de las diferentes partes del champiñón.

	Ergosterol (mg/g, p.s.)
Sombrero	5,86±0,53 *
Laminillas	11,02±0,84 ***
Tallo	4,4±0,42 *
Micelio	6,1±0,87

Valor de significación respecto al micelio *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Estos resultados muestran que el contenido de ergosterol en todas sus partes no es igual, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Tabla R.12) ($p < 0,001$). Los mayores niveles de ergosterol se encuentran en las laminillas (11,02±0,84 mg/g, p.s.), y los más bajos en los tallos (4,4±0,42 mg/g, p.s.). Al realizar el análisis estadístico al comparar los valores más bajos (entre tallo y micelio), ya se observa una significancia de $p < 0,05$. Esta diferencia también se aprecia significativa entre el micelio y el sombrero con $p < 0,05$ y alcanza valores muy superiores, $p < 0,001$ entre micelio y laminillas. El contenido en ergosterol en las laminillas es prácticamente el doble del que se encuentra en el sombrero, que a su vez es casi el doble de la concentración encontrada en el tallo. Resultados semejantes han encontrado otros autores en otros hongos comestibles ([Jasinghe y Perera, 2005;2006](#)).

Por otro lado, el análisis de *A. bisporus*, cultivado en cámaras de cultivo y no irradiados, en cuanto a su contenido en vitamina-D2, muestra que el contenido en esta vitamina es prácticamente nulo. A este respecto otros investigadores también han

encontrado ausencia de vitamina-D2 en hongos cultivados (Mattila et al., 2002a). Esto es debido a que estos hongos, durante su cultivo, no están expuestos, en ningún momento, a luz solar o ultravioleta. La mayoría de los hongos comestibles disponibles en el mercado son hongos cultivados y por tanto carentes de vitamina-D. Sin embargo, en algunos estudios, sí se ha detectado la presencia de pequeñas cantidades de vitamina-D2: 0,0004 µg/g p.s. (Takeuchi et al., 1984) y 0,23-1,10 µg/g p.s. (Takamura et al., 1991) en hongos comestibles, concretamente en Shiitake. Pequeñas cantidades de vitamina-D2 se han encontrado en hongos comestibles silvestres (Mattila et al., 1994), lo que probablemente sea debido a la acción de la luz solar por exposiciones breves periódicamente.

4.5.1. Estudios preliminares a distintas λ

Los anteriores estudios se realizaron con luz-UVB. Sin embargo dentro del espectro de la luz-UV podemos distinguir tres regiones: luz-UVA (315-400nm; pico a 365 nm), luz-UVB (280-315 nm; pico a 302 nm) y luz-UVC (200-280nm; pico a 254 nm). Por ello en este apartado se ha estudiado el efecto de la radiación a diferentes longitudes de onda sobre la fotoconversión del ergosterol en Vitamina-D2, a un tiempo fijo (15 min) y a una distancia fija (15 cm) irradiando los champiñones 15 min boca abajo (sombrero) y 15 min boca arriba (laminillas). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla-R.13.

Tabla-R.13. Valores de Vitamina D2 obtenidos a distintas longitudes de onda UV (A, B y C) en 30 minutos y valores obtenidos mediante exposición a luz solar.

	Vit-D2 (µg/g d.m.)	Observaciones
UV-A (365 nm)	4,34±0,3 *	30 min a 15cm
UV-B (302 nm)	4,61±0,7 **	30 min a 15 cm
UV-C (254 nm)	4,46±0,8 *	30 min a 15 cm Aparece pardeamiento°
Luz solar °°	2,8±0,5	> 2 h

Significancia respecto a irradiación bajo luz solar. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Las muestras no presentaron significancia entre los tipos de irradiación artificial. ° Indicios de productos no deseables, °°24 de Junio, 2016 (Sevilla)

Aunque de los datos mostrados en la Tabla-13 no se observan diferencias estadísticamente significativas, teniendo en cuenta que sistemáticamente los mayores resultados se han obtenido con luz-UVB, a partir de este punto, la irradiación utilizada en los posteriores estudios ha sido dicha radiación (luz-UVB).

Por otro lado, teniendo en cuenta que según la bibliografía, diferentes factores, tales como: humedad, temperatura, orientación y distancia, pueden afectar la eficiencia de la radiación-UV ([Jasinghe y Perera, 2005](#)), una vez fijado el tipo de irradiación (luz-UVB) a utilizar, pasamos a estudiar el efecto de los parámetros o factores anteriormente indicados sobre la fotoconversión de ergosterol en vitamina-D2.

4.5.2. Efecto de la humedad sobre la fotoconversión.

En este apartado se ha estudiado el efecto de la humedad de los champiñones a irradiar sobre la fotoconversión del ergosterol en Vitamina-D2, a un tiempo fijo (30 min) y a una distancia (intensidad de radiación) fija (15 cm), utilizando luz UV-B. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla-R.14.

Como puede observarse de los resultados expuestos en la Tabla-R.14, el mejor rendimiento ($15,03 \pm 1,1$ µg/g, p.s.) se obtiene para una humedad del $79 \pm 0,8$ %. Si bien, como esto implicaría introducir una etapa previa de ligero secado, previamente a la irradiación-UVB lo que complicaría y encarecería el proceso, nos hemos centrado en el estudio de los champiñones con una humedad equivalente a la habitual tras la cosecha ($92,4 \pm 0,6\%$) para la cual los niveles de vitamina-D2 son de $11,21 \pm 1,6$ µg/g, p.s. No obstante este proceso de deshidratación parcial si presenta una diferencia significativa al alza ($p < 0,05$) en la fotoconversión bajo las condiciones establecidas y podría ser aprovechada en caso de que el producto final fuese distinto del champiñón fresco para consumo.

Tabla-R.14. Efecto de la humedad sobre la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 por irradiación con luz-UVB.

Humedad (%)	Vit-D2 (µg/g p.s.)	Observaciones
60,3±1,1	8,36±2,3	
63,1±0,9	8,94±1,8	
72,8±0,7	12,25±2,1	
73,5±2,0	12,87±1,3	
79,0±0,8	15,03±1,1 *	Óptimo
83,1±1,3	11,63±0,9	
92,4±0,6	11,21±1,6	CH-fresco

UV-B; 15 cm; 60 min *p<0,05,

4.5.3. Efecto de la temperatura sobre la fotoconversión

En este apartado se ha estudiado el efecto de la temperatura de los champiñones, con su humedad habitual (92,4±0,6%), sobre la fotoconversión del ergosterol en Vitamina-D2, a un tiempo fijo (30 min) y a una distancia (intensidad de radiación) fija (15 cm), utilizando luz UV-B como fuente de irradiación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla-nn.

Como puede observarse de los resultados expuestos en la Tabla-R.15, el mejor rendimiento (22,53±3,74 µg/g, p.s.) se obtiene para una temperatura de 35°C y una humedad del 92,4±0,6%. Esto implicaría introducir una etapa de calentamiento, previamente a la irradiación-UVB. Lo que complicaría y encarecería el proceso. Sin embargo, cuando el proceso de irradiación tiene lugar con la humedad habitual y a la temperatura de cosecha (10 - 15°C), los niveles de vitamina-D2 alcanzados son significativamente más bajos, 7,62±1,16 µg/g, p.s., y 10,01±1,23 µg/g, p.s., respectivamente.

Tabla-R.15. Efecto de la temperatura sobre la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 por irradiación con luz-UVB.

°C	µg/g, p.s.	Observaciones
10	7,62±1,16	Temperatura habitual de trabajo
15	10,01±1,23	Temperatura habitual de trabajo
20	12,82±2,21	
25	13,87±2,68 *	
30	16,05±3,05 **	
35	22,53±3,74 ***,\$	Temperatura optima
40	13,24±3,21	
50	7,16±2,65	
60	4,48±2,42	

Valores de significancia respecto a 10°C *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.
Valores de significancia respecto a 15°C \$p<0,001

Estos resultados también muestran que mientras que a temperaturas por debajo de 35°C el aumento de temperatura va asociado a un incremento de la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2, a temperaturas por encima de 35°C la fotoconversión de ergosterol en vitamina-D2 es mucho menos eficiente. Esta disminución de eficiencia se atribuye a la participación de diferentes eventos, tales como el estrés térmico (oxidativo), muerte celular, formación de pigmentos coloreados, transformaciones de la vitamina-D2, así como a la fotodegradación por irradiación ([Jasinghe y Perera, 2005;2006](#)).

4.5.4. Efecto de la orientación y geometría sobre la fotoconversión

Los anteriores datos indican que la exposición a la luz-UVB induce la aparición de vitamina-D2 en los hongos, y que esto depende tanto de la humedad, como de la temperatura y de la parte del champiñón irradiado. Por ello irradiamos el champiñón boca abajo (sobrero frente a la fuente de luz-UVB) y el champiñón boca arriba (laminillas frente a la fuente de luz-UVB).

Las irradiaciones se han llevado a cabo tal y como se describe en el correspondiente apartado de M&M. Brevemente, se ha utilizado una lámpara UVP- LMS EL Series, de

8W/m² a una distancia, de 15 cm y se ha medido la intensidad de la radiación con un radiómetro óptico, siendo ésta al cabo de 30 min de 13,2 kJ/m². Los resultados obtenidos, tras dicho tratamiento sobre champiñones boca abajo y boca arriba, se muestran en la Figura-R.16.

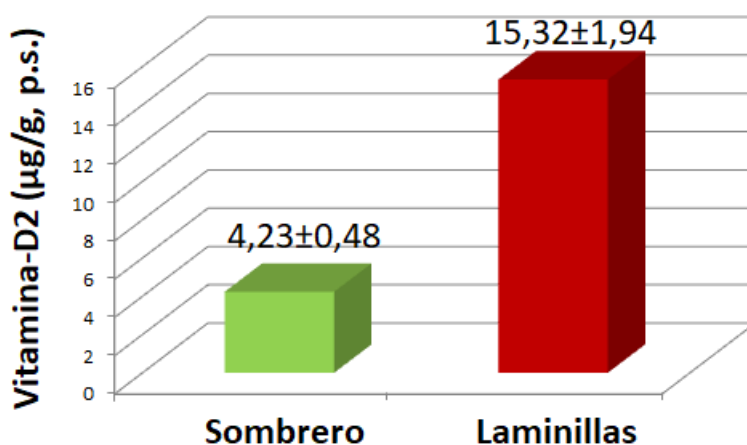


Figura-R.16. Contenido en vitamina-D2 tras la irradiación con luz-UVB de champiñones boca arriba (Sombrero) y champiñones boca arriba (Laminillas)

Estos resultados muestran que la fotoconversión de ergosterol en vitamina-D2 es mayor cuando los champiñones se irradian boca arriba (laminilla): 15,32±1,94 µg/g p.s., que cuando la irradiación se hace boca abajo (sombrero). 4,23±0,48 µg/g p.s. Como puede observarse el contenido en vitamina-D2 es estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Estos valores son ligeramente más bajos que los encontrados por otros autores (**Mau et al., 1998**) en Shiitake irradiado con luz-UVB y UVC.

Como podemos observar de estos datos, aunque el contenido en ergosterol de las laminilla es prácticamente el doble (1,88 veces) que el del sombrero, el contenido en vitamina-D2, tras la irradiación con luz-UVB en las condiciones descritas, en las laminilla es prácticamente cuatro veces mayor (3,62 veces). Indicando una alta fotoconversión de ergosterol en vitamina-D2, probablemente debido a la propia morfología de las laminillas que proporcionan una mayor superficie expuesta a la radiación que en el sombrero, además de que la mayor solidez-rigidez del sombrero muestre una mayor resistencia a la penetración de la radiación-UV a los tejidos miceliales del sombrero. Resultados semejantes han sido obtenido también por otros autores (**Jasinghe y Perera, 2005;2006**).

Estos datos, por otro lado, parecen estar indicando también que a mayor concentración de ergosterol mayor formación de vitamina-D2 tras la irradiación-UV. Lo que constituye la base de nuestra idea inicial: *“Si incrementamos el contenido en ergosterol en A. bisporus, mediante la adición de sustancias estimulantes al compost, la irradiación de estos champiñones contendrán mayor cantidad de vitamina-D2 que los champiñones crecidos en compost sin suplementar”*.

Es importante recordar que la fotoconversión del ergosterol a vitamina D2 se debe a la acción de la luz ultravioleta, pero que la penetrancia en los tejidos del hongo es muy limitada, por lo que se describe que solo actúa “en superficie”. No obstante el sustrato de la fotoconversión, el ergosterol, está distribuido por toda la biomasa del hongo, aunque como hemos podido observar, no todas las estructuras presentan la misma concentración. Esto supone que existe una diferencia que no es proporcional entre el incremento de superficie y de volumen lo que implicaría, la proporción de biomasa accesible a la luz ultravioleta respecto a la biomasa total disminuye al aumentar el tamaño del champiñón.

Si reducimos la estructura de un champiñón a formas geométricas simples es posible visualizar gráficamente la evolución de la relación superficie/volumen (Figura R.17). No obstante, el champiñón en etapas tempranas del desarrollo tiene un aspecto más globoso que uno maduro en el que el sombrero se encuentra completamente abierto. Si consideramos un champiñón en los primeros estados del desarrollo como una esfera y representamos gráficamente la relación entre su superficie ($4\pi R^2$) y su volumen ($4/3\pi R^3$) la curva resultante se ajusta a una curva exponencial $y=3x^{-1}$.

Si en cambio simplificamos un champiñón en estados de maduración más avanzados, con un cuerpo fructífero con las laminillas expuestas, la forma geométrica más apropiada podría considerarse una semiesfera. Para calcular la superficie de una semiesfera, se considera la mitad de una esfera y la superficie de un círculo ($(4\pi R^2)/2 + \pi R^2$) mientras que el volumen correspondería a la mitad de una esfera ($(4/3\pi R^3)/2$). La representación gráfica de esta relación también genera una curva exponencial, pero con una pendiente mayor ($y=4,5x^{-1}$), lo que implicaría una mayor biomasa expuesta respecto a la total.

En el caso del champiñón laminado, o en otros hongos comestibles como podría ser *Pleurotus ostreatus*, es posible representarlos como cilindros planos con una altura entre 0,5 y 1 cm. La superficie de un cilindro ($2\pi Rh + 2\pi R^2$) y su volumen ($\pi R^2 h$) (representado en la Figura-R.17 con una altura de 1 cm) genera una curva mucho menos pronunciada manteniendo la relación entre la superficie y el volumen más alta al aumentar el tamaño.

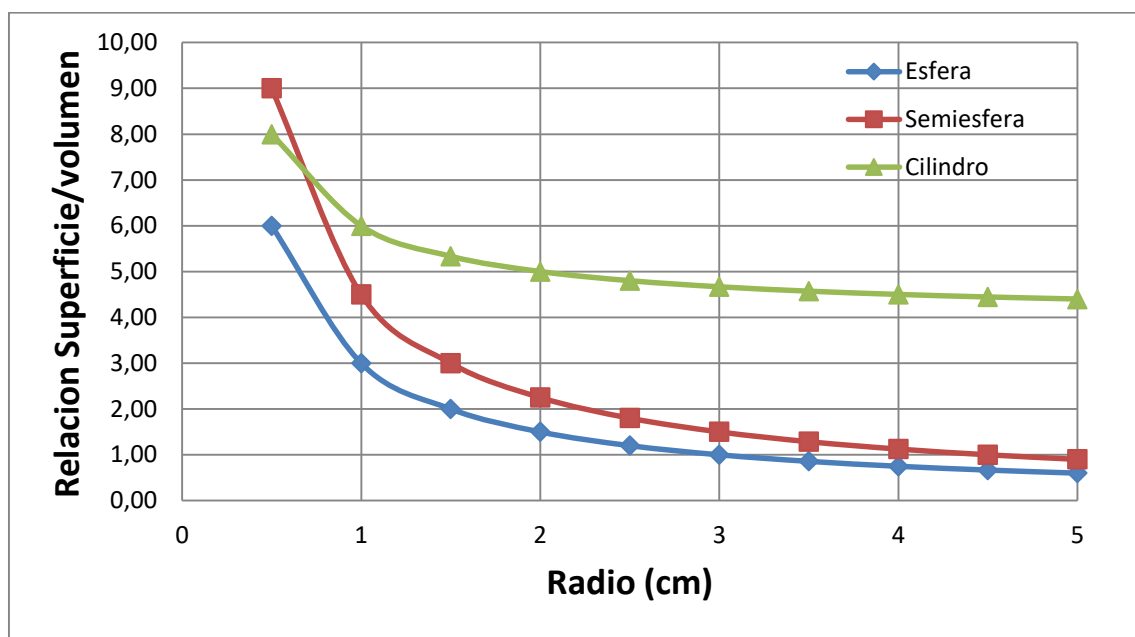


Figura-R.17. Representación gráfica de la relación Superficie/Volumen para una esfera, una semiesfera y un cilindro respecto incremento de su radio.

Al comparar de forma conjunta estas graficas es apreciable la rápida disminución de la biomasa expuesta respecto al total de la biomasa lo que puede perjudicar la tasa de fotoconversión del Ergosterol en vitamina D2 cuando los hongos tratados tienen diámetros grandes. Del mismo modo, debería ser posible obtener mayores rendimientos si se requiriese realizando laminados en los que se optimizase el grosor a la penetrancia de la longitud de onda empleada para el tratamiento o exponiendo toda la biomasa a la fuente de luz ultravioleta mediante un proceso de triturado si se deseara. En cualquier caso esta metodología sólo supone una aproximación simplificada en la que se omiten factores como la diferente concentración de ergosterol en las laminillas, así como la estructura que presentan, o la longitud de los tallos y diferentes morfologías que se puedan apreciar en los champiñones.

4.6. CINÉTICA DE LA FOTOCONVERSIÓN DEL ERGOSTEROL EN VITAMINA-D2 POR IRRADIACIÓN UVB

4.6.1. Cinética de la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2

Los estudios cinéticos son muy útiles para estudiar el orden de la reacción, permitiéndonos el cálculo de la cantidad de producto formado en una determinada reacción. Por ello en este apartado del estudio, los champiñones (*A. bisporus*) se han irradiado a una temperatura próxima a la temperatura de cosecha (10 - 15°C) durante diferentes periodos de tiempo con el fin de estudiar la fotoconversión del ergosterol presente en los champiñones en vitamina-D2 en relación con el tiempo de irradiación. Los champiñones se han utilizado con su humedad habitual ($92,4 \pm 0,6\%$) y la irradiación de luz-UVB utilizada ha sido de $0,21 \text{ kJ/m}^2/\text{min}$.

En la Tabla-R.16 y en la Figura-R.18 se muestra el contenido en vitamina-D2 de muestras de champiñón (*A. bisporus*) sometidas a radiación con luz-UVB durante diferentes periodos de tiempo (10 a 60 min).

Tabla-R.16. Efecto del tiempo de irradiación sobre la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 en muestras de champiñón (*A. bisporus*)

Tiempo (min)	Vitamina-D2 ($\mu\text{g/g}$, p.s.)
10	6,1
15	7,3
20	9,0
25	10,9
30	12,5
35	13,8
40	15,2
45	16,7
50	18,8
60	21,1

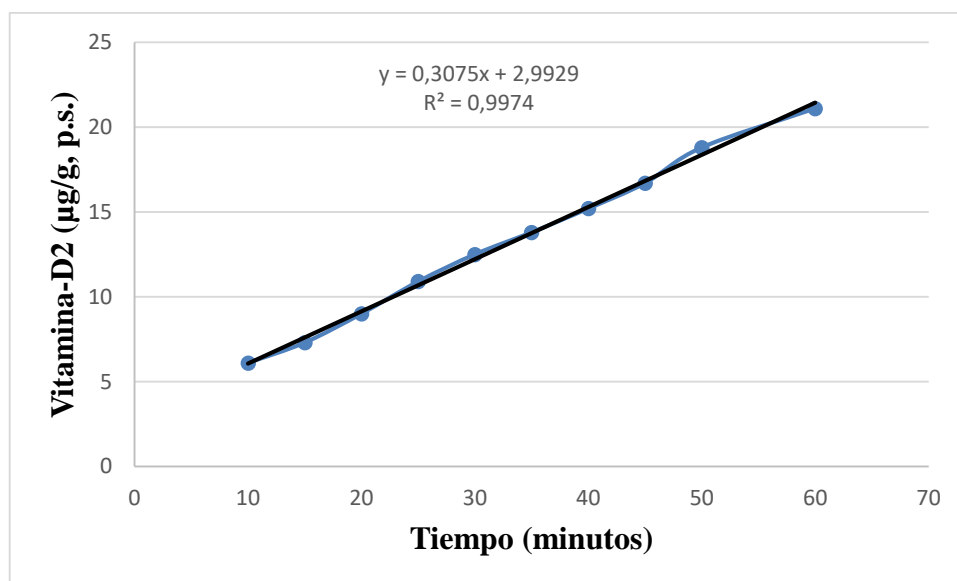


Figura-R.18. Efecto del tiempo de irradiación sobre la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 en muestras de champiñón (*A. bisporus*)

De acuerdo con estos datos, la fotoconversión de ergosterol en vitamina-D2 podemos predecirla a partir de la siguiente ecuación:

$$[\text{Vit-D2}] = 0,31 \cdot t + 2,99$$

Donde la concentración de vitamina-D2 viene expresada en µg/g, p.s., y el tiempo, t, en minutos. Si bien cabe comentar que a partir de los 55 min de irradiación, la fotoconversión de ergosterol en vitamina-D2 no es lineal, al menos bajo las condiciones utilizadas por nosotros y con un sistema de irradiación en continuo. En el caso de utilizar un sistema de irradiación por pulsos el rango de linealidad podría ser mayor, como han reportados otros grupos ([Kalaras y col., 2012a](#)).

4.6.2. Modelo cinético de la fotoconversión del ergosterol

Nuestros resultados sobre la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 por irradiación con luz-UVB, en nuestro sistema y bajo nuestras condiciones, en muestras de champiñón (*A. bisporus*) muestran una buena correlación lineal, al menos en el intervalo de 10 a 55 min (ver Tabla-R.16 y Figura-R.18). Lo que viene reflejado por el valor de $R^2 = 0,9972$ entre la cantidad de vitamina-D2 por gramo de producto seco y el tiempo de irradiación. Esta tendencia es consistente con los tres intervalos de temperatura y tiempos estudiados en este trabajo. Por lo tanto, parece razonable

proponer una cinética de orden cero para la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2.

$$dD/dt = KC^0 \quad (\text{ec.-1})$$

Donde C es la concentración de vitamina D2 en $\mu\text{g/g}$, p.s., t es el tiempo de irradiación, en s, y K es la constante de reacción en s^{-1} .

Uno de los modelos más usuales para analizar la relación entre la temperatura y la velocidad de reacción es la ecuación de Arrhenius (**Banga y Singh, 1994**). Este modelo ya ha sido utilizado para estudiar la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 en muestras solubles (**Mau y col., 1998**), por lo que parece apropiado también utilizarlo en matrices sólidas para intentar describir la relación o interdependencia entre la temperatura y la constante de reacción, que viene dada por la ecuación de Arrhenius:

$$K = A_0 \exp(-E_a/RT) \quad (\text{ec.-2})$$

Donde A_0 es el factor de frecuencia de la reacción, E_a es la energía de activación del ergosterol en vitamina-D2 (J mol^{-1}), R es la constante de los gases ($8,314 \text{ J } ^\circ\text{K mol}^{-1}$), y T es la temperatura absoluta ($^\circ\text{K}$).

4.6.3. Parámetros cinéticos del modelo

El modelo cinético descrito por las ecuaciones 1 y 2 se ha utilizado para la derivación de los distintos parámetros cinéticos a partir de los datos experimentales obtenidos en el presente estudio. Así la ec.-1 se ha utilizado para obtener los datos cinéticos a diferentes tiempos de irradiación para cada una de las temperaturas a que se han llevado a cabo los ensayos (Figura-R.18).

La pendiente de cada recta nos da el valor de K a cada una de las temperaturas ensayadas, que mediante la ec.-2 nos permite obtener el valor del factor de frecuencia de la reacción ($A_0 = 7,32 \text{ s}^{-1}$) y la energía de activación de la fotoconversión ($E_a = 51,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, $R^2 = 0,99$) (Figura- R.18). Estos parámetros cinéticos únicamente son válidos para el rango de temperaturas ensayados ($25 - 35 \text{ }^\circ\text{C}$). Valores para la energía de

activación de la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2, en el rango de 4,2 a 28,7 kJ mol⁻¹, dependiendo del disolvente y de la longitud de onda de la luz-UV, han sido reportados por otros investigadores en otros hongos comestibles (Mau y col., 1998). Estos parámetros cinéticos pueden utilizarse para estimar la cantidad de vitamina-D2 producida por irradiación-UVB durante un determinado tiempo dentro del rango de temperatura estudiado.

4.7. EFECTO COMBINADO DE LA HUMEDAD Y LA TEMPERATURA DE IRRADIACIÓN SOBRE LA FOTOCONVERSIÓN DEL ERGOSTEROL EN VITAMINA-D2.

El contenido en humedad del champiñón (*A. bisporus*) y la temperatura a que se lleva a cabo la irradiación con luz-UVB son dos parámetros importantes a controlar en la fotoconversión del ergosterol en vitamina-D2 (Jasinghe y col., 2004). El efecto combinado de estos dos factores se ha llevado a cabo mediante un modelo factorial 2 x 2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla-R17.

Tabla- R.17. Efecto combinado de humedad y temperatura

Temperatura (°C)	Humedad (%)	[Vit-D2] (µg/g p.s.)				Valor promedio
		1	2	3	4	
15	60	4,77	6,12	5,50	5,65	5,51
35	60	18,42	17,18	16,14	18,13	17,47
15	80	10,71	11,72	11,38	12,03	11,46
35	80	25,85	25,51	23,36	27,52	25,56

Como hemos indicado, el estudio se ha llevado a cabo mediante un modelo factorial 2 x 2, por lo que los valores registrados corresponden a cuatro condiciones experimentales diferentes (Tabla-R17). Como podemos observar, el máximo valor promedio de vitamina-D2 (25,56 µg/g p.s.) se ha obtenido para los champiñones con una humedad del 80% a una temperatura de 35°C, seguido de los champiñones con una humedad del 60% a una temperatura de 35° (17,47 µg/g p.s.). Mientras que el valor más bajo (5,51 µg/g p.s.) se ha obtenido para champiñones con una humedad del 80% a 15°C. Los valores promedios se han obtenido a partir de cuatro replicas, y los datos se han procesado ajustándolos a un modelo factorial 2 x 2.

4.8. TOXICIDAD, BIACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE LA VITAMINA-D2 EN CHAMPIÑONES (*Agaricus bisporus*) CRECIDOS EN COMPOST SUPLEMENTADO CON HTCH O HHO E IRRADIADOS CON LUZ-UVB.

4.8.1. Toxicidad

Los champiñones (*A. bisporus*) enriquecidos en vitamina D2 mediante tratamiento con luz UVB podrían considerarse como alimentos funcionales o nutraceuticos por si mismos o como componente en formulaciones gracias a sus beneficios para la salud. No solo proveen nutrientes (hidratos de carbono, proteínas vitaminas y minerales) sino que además contienen un perfil único de componentes bioactivos beneficiosos para la salud, en especial aquellos con actividades antioxidantes y antivirales ([Cremades y col., 2012; 2015; Gallego-Yerga, 2015](#)).

Pese a que la mezcla de compuestos presentes en *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2 está compuesta principalmente por componentes polares de naturaleza hidrosoluble ([Kalač, 2009](#)), los componentes apolares también representan una fracción importante. La composición hidrosoluble de *A. bisporus* determinada por Delgado-Poverano y col. ([2016](#)) mediante espectroscopia de masa de alta resolución, empleando cromatografía líquida en tándem acoplada a espectrometría de masa con tiempo de vuelo (LC-QTOF MS/MS), permitió la identificación de 123 compuestos que se pueden agrupar en 21 grupos, incluyendo: alcaloides, aminoácidos y sus derivados, mono y oligosacáridos, azúcares ácidos y derivados, ácidos grasos y ácidos grasos conjugados, fosfolípidos y sus derivados, y nucleótidos y sus derivados, entre los más significativos.

La mayoría de los compuestos presentes son seguros, aunque algunos han sido considerado tóxicos en el pasado a concentraciones relativamente bajas como la agaritina que en algunos estudios ha sido descrita como un producto potencialmente carcinogénico. No obstante, la evidencia actual indica que la agaritina presente en *A. bisporus* cultivado no supone un riesgo toxicológico para los humanos ([Roupas y col., 2010](#)).

Para evaluar la seguridad de *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 como un posible alimento funcional o un suplemento para consumo humano, es necesario disponer de datos sobre los riesgos debido a la posible toxicidad aguda (LD₅₀) y crónica derivados de la ingesta repetida a lo largo de periodos prolongados de tiempo.

Pese a que, en el análisis in silico, en la base de datos de TOXNET, el análisis de 95 de los compuestos encontrados en *A. bisporus* no reveló toxicidad potencial, se decidió comprobar la seguridad de los champiñones enriquecidos en vitamina D2 mediante la exposición puntual a altas dosis (toxicidad aguda) y la exposición elevada durante exposición prolongada (toxicidad sub-crónica) (90 días).

4.8.1.1. Estudio de Toxicidad aguda de *A. bisporus* enriquecido con Vitamina D2

Para evaluar los potenciales efectos adversos de *A. bisporus* enriquecidos en Vitamina D2 a dosis altas, se llevó a cabo un estudio de toxicidad aguda. Ante la ausencia de datos sobre la mortalidad de este producto, por razones de bienestar animal se recomendó comenzar con una dosis inicial de 300 mg/kg de peso corporal aumentando la dosis a 3.000 mg/kg. En la Tabla-R.18 se muestran los efectos y comportamiento de los animales tratados con una única dosis de 5.000 mg/Kg de peso corporal.

Tabla-R.18. Toxicidad aguda 5.000 mg/kg p.c.

Observación	Tras la administración			
	4 horas	8 horas	24 horas	14 días
Piel y pelaje	Normal	Normal	Normal	Normal
Ojos	Normal	Normal	Normal	Normal
Membrana mucosa	Normal	Normal	Normal	Normal
Patrones de comportamiento	Normal	Normal	Normal	Normal
Salivación	Normal	Normal	Normal	Normal
Letargia	Normal	Normal	Normal	Normal
Diarrea	No observado	No observado	No observado	No observado
Temblores	No observado	No observado	No observado	No observado
Coma	No observado	No observado	No observado	No observado
Muerte	No observado	No observado	No observado	No observado

Estos resultados muestran que *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 a dosis de 5000 mg/kg de peso corporal no causa mortalidad ni ningún otro signo o efectos adversos, a lo largo de los 14 días que duró el estudio. Así, a lo largo del estudio ningún síntoma clínico o alteraciones han sido observadas, ni en el pelaje, la coloración de los ojos, astenia, anorexia, salivación, piloerección, actividad locomotriz o diarrea en ninguno de los animales tratados. El peso corporal, y el consumo de comida se

mantuvieron sin diferencias respecto al grupo control. Los órganos internos (hígado, riñones, cerebro, corazón, pulmones, bazo, y timo) no mostraron signos inusuales ni en la forma ni en la coloración.

Puesto que es posible que el consumo de *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 puedan tener relevancia sobre la salud en humanos, estos estudios preliminares con este alimento funcional o nutraceutico se incluyó excepcionalmente una dosis adicional de 5.000 mg/kg de peso corporal, obteniéndose resultados totalmente análogos a los descritos para la dosis de 3.000 mg/kg p.c. Puesto que no se observó ningún fallecimiento la DL_{50} no pudo ser estimada, si bien, únicamente cabe esperar que sea superior a 5.000mg/kg de p. c. Ante estos datos podemos concluir que la toxicidad de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2, administrado por vía oral, estaría clasificado dentro de la categoría 5 o incluso no se podría clasificar de acuerdo con la GHS (*Globally Harmonized System of classification and Labelling of Chemicals*; Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos).

En resumen, de acuerdo con nuestros datos, es posible afirmar que la no existencia de daños o mortalidad en la administración oral de este estudio puede considerarse como prueba de seguridad del consumo, a corto plazo, de *A. bisporus* enriquecido con vitamina D2.

4.8.1.2. Estudio de la toxicidad sub-crónica de *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2

La evaluación de la toxicidad sub-crónica por vía oral se llevó a cabo para intentar determinar los efectos nocivos para la salud ante la exposición reiterada durante prolongados periodos de tiempo. El estudio se llevó a cabo empleando animales juveniles de 6 – 8 semanas. No se manifestaron anomalías clínicas o de comportamiento, ni fallecimientos durante el periodo de tratamiento o consumo de *A. bisporus* enriquecido con vitamina D2, ni durante el periodo de recuperación, para ninguna de las dosis ensayadas (250 y 500 mg/kg de p. c.). Todos los animales en el grupo control y en los grupos con tratamiento sobrevivieron hasta las necropsias programadas en los días 91 y 119.

-Efectos de la toxicidad sub-crónica en la administración oral de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2 sobre el peso corporal, y el consumo de alimentos y agua.

Como se muestra en la Figura-R.19.1A en relación con el peso corporal no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para las ratas hembra, tanto en los grupos tratados con *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 (con ambas dosis) y el grupo control. No obstante, en el caso de los machos, en el grupo al que se le ha administrado la dosis mayor (500 mg/kg p.c.) el peso de los animales ha sido ligeramente inferior al peso de los animales del grupo control al final del periodo de recuperación (28 días) 329±11 g y 349±8 g, respectivamente aunque sin alcanzar valores significativos (Figura-R19.1B).

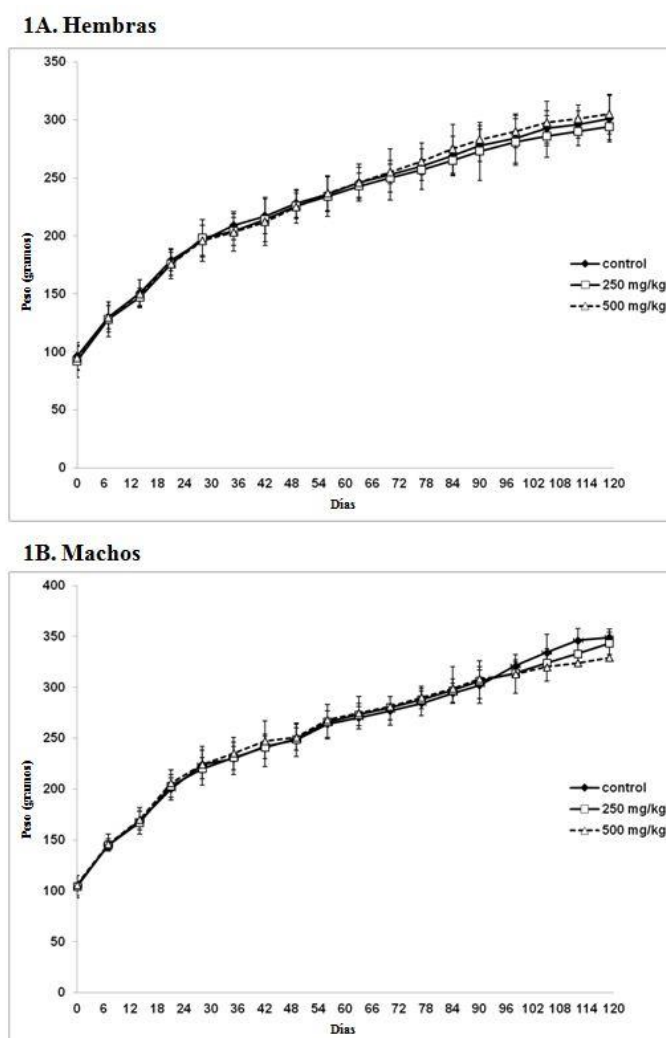


Figura-R.19. Peso de las ratas (hembras y machos) observado en los grupos tratados con *A. bisporus* enriquecidos en Vitamina D2 (250 y 500 mg/kg p.c) y el grupo control al final del tratamiento (91 días) y del periodo de recuperación (119 días)

Como puede observarse no se apreció una diferencia significativa en el consumo de comida y agua entre los grupos tratados y el control al final de ambos periodos, el de tratamientos y el de recuperación. Puesto que no se observan diferencias significativas en el peso corporal, ni en el consumo de agua y alimentos, durante el periodo de tratamiento ni el de recuperación no parece que exista ningún efecto perjudicial sobre la administración oral de *A. bisporus* enriquecido con vitamina D2 ya que los cambios en estos parámetros se han empleado como indicadores de efectos adversos en medicamentos y productos químicos (Teo y col., 2002; Carrillo y col., 2014). Así pues, partir de los datos obtenidos podemos concluir que hasta dosis de 500 mg/kg de peso corporal, *A. bisporus* enriquecido con vitamina D2, no presentan toxicidad en ratas Wistar.

-Efectos de la toxicidad sub-crónica tras la administración oral de A. bisporus enriquecidos en vitamina D2 sobre los parámetros sanguíneos.

Al final de los periodos de tratamiento y recuperación se recolectaron muestras de sangre para el análisis hematológicos, bioquímicos y de coagulación en los diferentes grupos, tratados a ambas dosis y control.

i) Efectos de A. bisporus enriquecido en vitamina D2 en los parámetros hematológicos.

Los efectos de la administración sub-crónica de *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 al final del tratamiento y del periodo de recuperación sobre los parámetros hematológicos se muestran en la Tabla-R.19. Al comparar estos resultados con los obtenidos para el grupo control, la mayoría de los parámetros hematológicos no presentan diferencias estadísticamente significativas. Únicamente se apreciaron diferencias estadísticamente significativas para ratas macho en Hb y en ratas hembras en Hb y VMC en el grupo con dosis de 500 mg/kg de peso corporal, aunque esas diferencias desaparecen al final del periodo de recuperación.

Los cambios en los parámetros hematológicos junto a los bioquímicos y de coagulación son importantes a la hora de evaluar riesgos en la salud del sistema hematológico. También son de importancia capital como los objetivos más sensibles para compuestos tóxicos y son claves para extrapolar los resultados fisiológicos y patológicos de estudios animales a humanos (Olson y col., 2000; Raza y col., 2002).

Tabla-R.19 Efecto de la administración sub-crónica oral de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2 sobre los **parámetros hematológicos** en ratas Wistar tras 91 días de tratamiento y 28 días de recuperación.

←-----Periodo de tratamiento-----→←-----Periodo de recuperación-----→

Sexo	Parámetro	Control (91 días)	250 mg/Kg/ Día (91 días)	500 mg/Kg/ Día (91 días)	Control (119 días)	250 mg/Kg/ Día (119 días)	500 mg/Kg/ Día (119 días)
Macho	HEM (10 ⁻⁶ /μl)	9,01±0,52	8,97±0,31	8,89±0,39	9,11±0,32	8,92±0,40	8,90±0,58
	HMT (%)	68,32±2,31	69,71±3,34	70,32±3,24	68,07±1,22	71,21±5,32	71,08±4,87
	Hb (g/dl)	15,30±0,42	15,11±0,53	16,14±0,38*	15,40±0,31	15,32±0,67	15,66±0,45
	VCM (fl)	79,22±3,15	80,07±2,61	79,89±3,13	80,12±2,74	81,31±4,02	81,45±3,78
	HCM (pg)	17,25±0,62	17,03±0,80	17,31±0,52	16,95±1,72	16,98±2,32	17,05±98
	CCMH (g/dl)	20,94±0,63	21,24±0,54	21,43±0,61	20,67±0,93	20,98±1,72	20,93±2,34
	PQT (10 ⁻³ /μl)	910±278	899±346	902±328	903±112	922±167	943±201
	TP (sec)	20,51±2,2	21,9±2,1	21,6±2,7	20,45±1,9	21,01±3,2	20,97±2,65
	LEU (10 ⁻³ /μl)	6,38±1,87	6,65±2,37	6,78±1,93	6,53±1,09	6,34±0,98	6,54±1,23
	NEU (%)	45,13±9,23	43,70±6,25	42,45±16,38	46,01±8,22	45,73±6,23	45,79±3,25
	LIN (%)	45,52±10,29	48,69±8,01	50,20±17,85	45,00±7,67	46,31±5,23	45,28±6,98
	MON (%)	4,61±0,45	3,52±0,93	3,40±1,70	4,31±0,71	3,31±0,82	4,16±0,83
	EOS (%)	4,23±0,39	3,72±1,11	3,53±1,08	4,06±0,43	4,12±0,65	4,09±0,62
	BAS (%)	0,41±0,21	0,37±0,18	0,32±0,19	0,62±0,17	0,53±0,44	0,67±0,33
Hembra	HEM (10 ⁻⁶ /μl)	7,95±0,42	7,90±0,44	7,86±0,65	8,06±0,51	7,92±0,55	7,92±0,53
	HMT (%)	66,33±2,81	65,26±3,53	64,98±4,83	68,02±5,72	67,45±6,21	67,93±5,04
	Hb g/dl)	13,52±0,53	14,01±0,74	14,81±0,61*	13,77±1,02	15,01±1,47	14,63±1,03
	VCM (fl)	82,91±2,30	83,13±3,1	88,73±3,03*	83,33±3,22	84,29±2,12	84,11±2,45
	HCM (pg)	17,44±1,02	17,52±0,93	17,91±1,04	17,89±0,97	18,11±2,01	18,04±1,77
	CCMH (g/dl)	20,73±0,41	21,00±0,24	21,12±0,54	21,01±0,88	21,28±1,05	21,67±1,12
	PQT (10 ⁻³ /μl)	877±123	921±254	942±234	902±187	920±89	934±105
	TP (sec)	27,9±10,3	26,01±14,2	24,5±12,8	28,3±3,03	27,16±2,89	27,23±3,45
	LEU(10 ⁻³ /μl)	5,02±1,31	4,79±1,04	4,93±1,76	5,23±0,87	4,95±0,93	4,98±1,32
	NEU (%)	41,11±9,87	40,81±10,3	51,18±14,23	44,23±11,21	46,42±14,03	45,98±10,08
	LIN (%)	54,27±8,82	54,48±12,67	42,01±11,34	48,43±10,34	47,87±16,34	47,43±8,91
	MON (%)	1,48±1,04	1,06±0,94	2,45±1,88	2,84±0,93	2,06±0,73	2,72±0,94
	EOS (%)	2,65±1,35	3,20±1,24	3,81±1,17	3,96±0,88	3,12±1,81	3,35±1,43
	BAS (%)	0,49±0,30	0,45±0,28	0,45±0,27	0,54±0,13	0,52±0,17	0,51±0,11

Tabla-R.20. Efecto de la administración sub-crónica oral de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2 sobre los **parámetros bioquímicos** en ratas Wistar macho tras 91 días de tratamiento y 28 días de recuperación.

Machos	←-----Treatment period-----→			←-----Recovery period-----→		
Parámetro	Control (91 días)	250 mg/Kg/ Día (91 días)	500 mg/Kg/ Día (91 días)	Control (119 días)	250 mg/Kg/ Día (119 días)	500 mg/Kg/ Día (119 días)
ALT (U/l)	41,32±5,72	38,93±10,21	36,75±11,44	42,17±6,12	40,98±5,33	40,12±6,82
AST (U/l)	145,1±42,13	126,8±37,66	115,7±42,16	139,28±32,41	131,82±41,65	144,33±29,05
FA (U/l)	83,7±12,7	74,8±17,1	76,0±12,7	77,98±8,19	81,45±12,40	87,34±10,58
ALB (g/dl)	3,72±0,21	3,80±0,12	3,78±0,13	3,76±0,14	3,91±0,23	3,82±0,14
GLB (g/dl)	2,43±0,36	2,64±0,13	2,61±0,17	2,55±0,28	2,87±0,05	2,70±0,17
ALB/GLB	1,56±0,19	1,44±0,05	1,45±0,04	1,49±0,11	1,54±0,07	1,42±0,11
PT (g/dl)	6,15±0,47	6,44±0,23	6,39±0,30	6,31±0,12	6,45±0,27	6,53±0,22
GLUC (mg/dl)	134,22±22,41	121,35±14,02	129,31±9,23	130,54±8,44	128,52±9,23	131,71±6,25
UREA (mg/dl)	13,95±1,47	14,79±1,90	15,23±2,34	15,65±1,89	15,32±2,06	15,89±1,07
CREA (mg/dl)	0,26±0,06	0,25±0,03	0,26±0,05	0,29±0,18	0,30±0,09	0,30±0,15
CT (mg/dl)	78,33±11,21	79,02±9,14	77,65±12,04	79,45±11,12	79,34±21,23	80,03±10,34
TG (mg/dl)	102,12±13,42	118,23±28,43	112,24±25,32	121,29±23,21	119,76±14,21	123,45±16,37
Na ⁺ (mmol/l)	135,61±4,85	133,93±2,35	136,92±5,86	138±3,22	139,98±3,65	141,12±4,67
K ⁺ (mmol/l)	5,36±0,98	5,28±1,11	5,11±0,98	5,27,93±0,96	5,16±0,93	5,09±1,05
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,43±0,12	2,62±0,25	2,55±0,43	2,57±0,21	2,64±0,25	2,56±0,40
Cl ⁻ (mmol/l)	105,07±3,91	104,17±2,83	102,33±4,65	107,51±4,15	106,72±3,76	103,22±5,43

Tabla-R.21. Efecto de la administración sub-crónica oral de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2 sobre los **parámetros bioquímicos** en ratas Wistar hembra tras 91 días de tratamiento y 28 días de recuperación.

Hembras	←-----Treatment period-----→			←-----Recovery period-----→		
Parámetro	Control (91 días)	250 mg/Kg/ Día (91 días)	500 mg/Kg/ Día (91 días)	Control (119 días)	250 mg/Kg/ Día (119 días)	500 mg/Kg/ Día (119 días)
ALT (U/l)	42,01±3,71	38,85±9,73	37,91±10,45	41,87±6,43	39,67±6,23	40,04±8,12
AST (U/l)	162,33±17,02	148,98±22,13	145,04±31,17	143,16±29,21	128,11±15,55	131,02±40,14
FA (U/l)	79,16±8,37	75,71±12,22	74,98±7,38	77,34±9,12	76,43±19,03	83,16±7,56
ALB (g/dl)	3,51±0,26	3,68±0,29	3,65±0,17	3,54±0,25	3,61±0,32	4,13±0,13**
GLB (g/dl)	2,22±0,35	2,47±0,33	2,51±0,20	2,55±0,28	2,24±0,07	2,77±0,20
ALB/GLB	1,60±0,14	1,51±0,08	1,46±0,06	1,40±0,06	1,62±0,19	1,51±0,16
PT (g/dl)	5,74±0,61	6,15±0,61	6,16±0,36	6,09±0,52	5,85±0,27	6,90±0,20*
GLUC (mg/dl)	128,12±7,23	132,09±11,01	137,44±9,67	130,11±10,78	135,17±14,23	137,56±9,08
UREA (mg/dl)	14,08±2,34	16,67±5,34	16,08±4,23	14,54±3,34	16,93±5,45	15,99±4,33
CREA (mg/dl)	0,32±0,12	0,31±0,08	0,32±0,09	0,33±0,12	0,34±0,10	0,33±0,14
CT (mg/dl)	82,34±9,26	84,11±9,03	85,08±10,34	84,36±7,33	86,21±11,34	87,31±12,31
TG (mg/dl)	111,64±14,21	123,45±11,08	126,04±20,45	117,55±9,36	128,09±13,79	130,61±16,08
Na ⁺ (mmol/l)	127,35±5,29	123,78±10,34	122,17±7,74	132,49±12,11	133,06±64	131,12±9,56
K ⁺ (mmol/l)	5,13±0,78	5,69±0,96	6,05±0,34	5,76±1,24	5,55±0,93	5,67±1,13
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,89±0,36	3,01±0,45	2,96±0,94	3,04±0,37	2,98±0,53	2,92±0,47
Cl ⁻ (mmol/l)	110,49±7,34	109,72±6,39	111,60±10,22	109,35±4,27	113,26±11,37	115,03±9,83

En este estudio, con la excepción de un incremento puntual en HGB en machos y HGB y MCV en hembras a dosis de 500 mg/kg de p. c. al día, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos respecto al grupo control. Además, al final del periodo de recuperación, no se encontró ninguna diferencia significativa respecto al grupo control, por lo que los resultados sugieren que el consumo regular de *A. bisporus* enriquecido con vitamina D2 no influye en estos parámetros en ratas Wistar.

ii) Efectos de A. bisporus enriquecido en vitamina D2 en los parámetros de coagulación

En relación con los parámetros de coagulación (APTT y PT), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y los grupos tratados con *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 ni al final del tratamiento ni del periodo de recuperación (datos no mostrados)

iii) Efectos de A. bisporus enriquecido en vitamina D2 en los parámetros bioquímicos

En las tablas-R.20 y R.21 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos al final del periodo de tratamiento para machos y hembras, respectivamente. Como puede observarse, ninguno de los parámetros mostro diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos tratados con *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2, con la excepción de un incremento significativo al final del periodo de recuperación de dos parámetros en el grupo tratado con la dosis de 500 mg/kg de peso corporal: ALB: $3,54 \pm 0,25$ y $4,13 \pm 0,13$ g/dL, respectivamente, ($p < 0,01$) y TP: $6,09 \pm 0,52$ y $6,90 \pm 0,20$ g/dL, respectivamente, ($p < 0,05$).

iv) Efectos de A. bisporus enriquecido en vitamina D2 en los parámetros electrolíticos sanguíneos

Para los parametros electrolíticos sanguíneos, analizados en machos y hembras al final del periodo de tratamiento y del periodo de recuperación, no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D2. (ver Tablas R.20 y R.21)

v) Efectos de la administración oral sub-crónica de A. bisporus enriquecido en vitamina D2 en el peso de los órganos.

En relación con estos parámetros, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo tratado con *A. bisporus* enriquecido con vitamina D2 a dosis de 500 mg/Kg de p. c., en el peso absoluto del cerebro ($2,04 \pm 0,11$ g y $1,91 \pm 1,63$ g, respectivamente, $p < 0,05$) y en el peso relativo del timo ($0,28 \pm 0,07$ g y $0,25 \pm 0,03$ g, respectivamente, $p < 0,05$), al final del periodo de tratamiento.

Se observó una disminución significativa entre el control y el grupo con la dosis de 500 mg/kg en el timo de las ratas macho ($0,40 \pm 0,08$ g y $0,30 \pm 0,07$ g, respectivamente, $p < 0,05$), mientras que se apreció un incremento significativo en el peso de las glándulas adrenales ($0,05 \pm 0,01$ g y $0,06 \pm 0,03$ g, respectivamente, $p < 0,05$). Al final del periodo de recuperación esta diferencia no pudo ser apreciada entre los grupos tratados y control para machos y hembras.

vi) Efectos de la administración oral sub-crónica de A. bisporus enriquecido en vitamina D2 en el análisis histopatológico.

El análisis histopatológico se llevó a cabo en los siguientes órganos: corazón, bazo, hígado, riñones, pulmones, cerebro, timo, testículos, útero y ovarios. No se apreciaron cambios patológicos ni en los grupos tratados con *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 ni en el grupo control, al final del periodo de tratamiento y del periodo de recuperación (datos no mostrados).

En resumen, *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 no presenta toxicidad aguda al no causar letalidad o efectos adversos en el comportamiento general, incluso cuando se ha administrado por vía oral la dosis más elevada (5000mg/kg de peso corporal). Así es posible considerar que no presenta toxicidad aguda. En cuanto a la toxicidad sub-crónica a dosis de 250 y 500 mg/kg de p. c., ésta sólo indujo alteraciones leves en algunos parámetros hematológicos y bioquímicos en las ratas. Por lo que, los resultados globales apoyan que el consumo de forma periódica y moderada de *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2, no presenta efectos no deseables o tóxicos para la salud. Por lo que se puede considerar un buen candidato para ser empleado como alimento funcional *per se*, o como componente de productos nutraceuticos. Si bien, a nuestro juicio, se precisan de más ensayos y estudios, en animales y humano, para confirmar definitivamente la ausencia de cualquier factor de riesgo.

4.8.2. Bioaccesibilidad

Digestión *in vitro* de champiñones crecidos en compost suplementado con HTCH y HHO

Los champiñones (*A. bisporus*) enriquecidos en vitamina D2 pueden contener una concentración determinada, pero ¿qué cantidad de esta vitamina D2 está disponible o accesible a ser absorbida por la barreraa gastro intestinal? Es decir, ¿cual es la bioaccesibilidad de la vitamina D2 de los champiñones enriquecidos en dicha vitamina? Una manera relativamente sencilla de obtener esta información es simulando el proceso de la digestión “*in vitro*”.

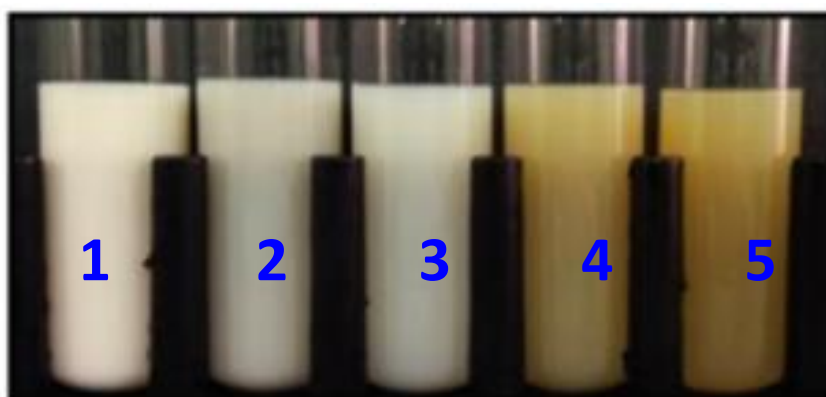
- Digestión *in vitro* de champiñones enriquecidos en vitamina D2

Los modelos de digestión *in vitro* son herramientas que facilitan la evaluación del efecto de la digestión humana sobre ciertos compuestos de interés, pero también se pueden utilizar para evaluar su influencia sobre las propiedades de una matriz alimenticia en su conjunto, como por ejemplo en el caso de champiñones (*A. bisporus*) enriquecidos en vitamina-D2. Así, una vez enriquecidos los cuerpos fructíferos de los hongos, por irradiación con luz-UVB, se han sometido a una digestión *in vitro* para investigar si la concentración en vitamina-D2 se altera o no, tras el proceso de masticación y de las digestiones gástricas e intestinales, y que cantidad, de la inicialmente disponible a nivel de digestión bucal, esta disponible en el intestino para ser absorbidas por las células epiteliales del borde en cepillo.

El estudio se hallevado a cabo con champiñones frescos (120 g p.h.) y con champiñones secos en forma de harina (12 g p.s.). El aspecto de los diferentes digeridos y de la fracción micelar, que es la que se enfrenta a las células del epitelio gastrointestinal, se muestran en la Figura-R.20.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, tras la simulación *in vitro* del proceso de digestión tal y como se ha descrito en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos, se mustran en la Tabla-R.22.

Estos resultados muestran que independientemente de que los champiñones enriquecidos en vitamina D2 se tomen frescos o secos, la vitamina D2 contenida en ellos presenta una bioaccesibilidad del orden del 60%, concretamente $65,0 \pm 4,0$ y $59,2 \pm 2,8$, respectivamente.



1 Homogenizado; **2** Digerido salival; **3** Digerido estomacal
4 Digerido intestinal; **5** Micelas

Figura-R.20. Aspecto de los diferentes digeridos obtenidos en la digestión *in vitro* de champiñones enriquecidos en vitamina-D2 (muestra M3).

Tabla-R.22. Bioaccesibilidad de la vitamina D2 presente en las micelas tras la digestión *in vitro*.

	Inicio (Homogeneizado)		Micelas	
M1	120g (0,35µg/g p.h.)	42,0 µg (100%)	25,7 µg	61,2%
M2	120g (0,37µg/g p.h.)	44,4 µg (100%)	30,7 µg	69,1%
M3	120g (0,32µg/g p.h.)	38,4 µg (100%)	24,9 µg	64,8%
				65,0±4,0
M1'	12g (3,91µg/g p.s.)	46,9 µg (100%)	27,4 µg	58,4%
M2'	12g (4,32µg/g p.s.)	51,8 µg (100%)	29,4 µg	56,8%
M3'	12g (4,01µg/g p.s.)	48,1 µg (100%)	30,0 µg	62,3%
				59,2±2,8

Con el fin de estudiar la cantidad de esta vitamina D2 que pasaría a la sangre y por tanto sería biodisponible para el organismo, pasamos a estudiar su absorción en un modelo *in vitro* utilizando para ello células Caco-2.

4.8.3. Biodisponibilidad

Una vez concluido el proceso de digestión, la fracción potencialmente bioaccesible (micelas) se añade a las monocapas de células Caco-2, desarrolladas sobre

membranas permeables en pocillos especiales, que van a permitir investigar la posible absorción *in vitro* de la vitamina-D2 presente en el digerido (micelas).

Antes de realizar los ensayos de absorción *in vitro* es necesario determinar la concentración a la cual se pueden aplicar las fracciones bioaccesibles para que no resulten tóxicas para las células. Según los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (Tabla-Rnn) de la última fracción resultante de las digestiones de *A. bisporus* enriquecidos en vitamina D (fracción correspondiente a las micelas), se pueden adicionar hasta un volumen máximo de 150 µl por pocillo consiguiendo el 100% de viabilidad de las células, después de las 3h de incubación.

Tabla-R23: Toxicidad de la fracción bioaccesible (micelas) sobre las células Caco-2. (Los resultados se expresan como porcentaje de células viables).

	200 µL	150 µL	100 µL	50 µL
Exp-1 (0,103 µg/mL)	87,2	100%	100%	100%
Exp-2 (0,123 µg/mL)	86,3	98%	100%	100%
Exp-3 (0,100 µg/mL)	84,3	100%	100%	100%

Este volumen de 150 µl se corresponde con una concentración de la fracción bioaccesible (micelas) aplicada de $0,109 \pm 0,012$ µg/mL de vitamina D2 presente en *A. bisporus* enriquecidos en dicha vitamina. Estos ensayos de absorción *in vitro* se han llevado a cabo durante 3 h, y al cabo de ese tiempo se ha recogido el compartimento apical y el basolateral y se ha medido su concentración en vitamina-D2. Así, la concentración de vitamina-D2 detectada en el compartimento apical se relaciona con la vitamina-D2 que no es absorbida a través de los enterocitos, mientras que la del compartimento basolateral corresponde con la vitamina-D2 que es absorbida por las células y transportada al torrente sanguíneo, es decir a la vitamina D2 biodisponibles, susceptible de ser transformada en las formas activas de esta vitamina en el hígado y riñón. En la Tabla-R.24 se muestran los resultados obtenidos para los tres ensayos realizados con champiñones frescos enriquecidos en vitamina D2.

Como podemos observar de los resultados obtenidos en los ensayos de absorción en células Caco-2, la vitamina-D2 de los champiñones enriquecidos en dicha vitamina por irradiados con luz-UVB es absorbida en un $78,2 \pm 4,2\%$, es decir la vitamina D2

ingerida presenta una biodisponibilidad del 50,8%. Es decir, la mitad de la vitamina D2 ingerida podría estar biodisponible.

Tabla-R.24: Biodisponibilidad de la vitamina D2 de champiñones enriquecidos en dicha vitamina en células Caco-2. (Los resultados se expresan como porcentaje de vitamina D2 presente en el compartimento apical y basolateral).

	Micelas	Compartimento apical	Compartimento basolateral
Exp-1	100%	17,8%* (24,6%)	75,4%*
Exp-2	100%	12,2%* (16,9%)	83,1%*
Exp-3	100%	18,1%* (23,8%)	76,2%*
		16,0±3,3% (21,8±4,2)	78,2±4,2%

*Valores medidos.

Teniendo en cuenta que los resultados presentados se han obtenido mediante ensayos *in vitro*, la corroboración e dichos datos mediante estudios *in vivo* serían de gran valor, midiendo la biodisponibilidad de la vitamina D2 como niveles de 25(OH)D2 que es el metabolito bioactivo de esta vitamina.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Resumiendo los resultados obtenidos en el plan de trabajo podemos obtener las siguientes conclusiones respecto a cada apartado principal:

MLmd es un medio mínimo apropiado para el crecimiento de *A. bisporus* mediante fermentación sumergida capaz de generar biomasa suficiente para su análisis. La adición de suplementos influye en el desarrollo de la biomasa hasta la aparición de un valor “*platou*”.

Analizando la proporción C/N de los suplementos y el impacto sobre el incremento de producción de biomasa en MLmd, los mejores resultados se obtienen con HALP, HHO y HTCH (con valores C/N de 27,3, 45,0 y 8,3 respectivamente). La Fracción Q/G, con una proporción C/N de 121,7 se encuentra bastante lejos del óptimo deseable en el compost y el efecto sobre la producción y composición de biomasa es limitado. Junto al coste adicional de la digestión enzimática necesaria para su obtención no parece ser un suplemento apropiado para su uso en el cultivo de *A. bisporus*.

Los sustratos EHO y LE-10x (12,4 y 11,4 respectivamente) poseen una proporción C/N óptima, sin embargo el impacto sobre el cultivo es muy inferior a la de HALP, HHO y HTCH. Esto es indicativo que la forma molecular en la que se encuentra el N en estos suplementos no es la más aprovechable por *A. bisporus* o que existe algún otro factor no reflejado que inhibe el desarrollo del micelio en estos suplementos.

La versión gelificada del MLmd, MSmd-agar presenta valores similares aunque con un incremento significativo de biomasa para todos los suplementos. El incremento de productividad en MSmd-agar puede verse beneficiado a una mejor disponibilidad de oxígeno y a la estructuración de las hifas en el medio sólido.

Los cultivos en compost mínimo ponen de manifiesto que HALP, HHO y HTCH pueden emplearse como suplementos para incrementar la productividad de forma significativa a partir de un 5% de suplemento en compost aunque otros suplementos empleados en la producción industrial pueden ofrecer mejores rendimientos.

La composición de *A. bisporus* se ve influenciada por la composición del medio en el que es crecido. El contenido en ergosterol presenta incrementos significativos al suplementarse con HHO en todos los medios de cultivo y en los medios sólidos y compost al suplementarse con HTCH. Ante estos resultados es posible confirmar que “es posible incrementar el contenido en ergosterol mediante suplementación dirigida” tanto en medios líquidos y gelificados, como en compost aunque dicho incremento no se produce al incluir un suplemento adicional de HHO o HTCH al compost suplementado para producción (suplementación mixta).

La composición químico-nutricional de *A. bisporus* no sufre grandes cambios en la composición general, pero es posible apreciar variaciones en las concentraciones de algunos compuestos de especial interés como AAsE, ergotioneina, ácidos grasos ω -3 y ω -6, compuestos fenólicos y por supuesto, el ergosterol.

A. bisporus presenta un contenido en AAsE superior al recomendado por la FAO por lo que se considera una buena fuente de proteína de elevado valor nutricional. La suplementación con HHO o HTCH incrementa marginalmente la proporción de estos AAsE. Por otro lado, si es posible apreciar una disminución significativa de los AAsA por lo que los champiñones crecidos en compost suplementado con HHO y HTCH ofrecen una mejor relación de Fischer y serían más aconsejables para el consumo de pacientes con enfermedades hepáticas.

Del mismo modo *A. bisporus* posee un bajo contenido en grasa y una buena proporción entre ácido linolenico (ω -6) y linoleico (ω -3). Aunque los champiñones crecidos en compost industrial ofrece la mejor proporción (4,8) los crecidos en compost suplementado con HTCH y HHO (6,1 y 6,4 respectivamente) siguen siendo recomendables para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Así mismo el incremento en polifenoles de bajo peso molecular puede colaborar a reducir el estrés oxidativo.

Mediante el análisis por western-blot se ha podido confirmar el incremento de la expresión de tres enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis del ergosterol. Al suplementar compost mínimo con HHO o HTCH se induce una regulación positiva sobre la síntesis del ergosterol aumentando de forma significativa el contenido del mismo en la biomasa. Las enzimas estudiadas ERG11, ERG6 y ERG2 presentan un incremento de expresión proteica de 3,52, 2,75 y 1,85 veces más respectivamente,

confirmando que existe una relación entre el incremento del contenido de ergosterol y el uso de estos suplementos.

Si podemos concluir que *A. bisporus* varia su composición, especialmente el contenido de ergosterol, según los suplementos empleados durante su cultivo, tanto en medios líquidos sumergidos como en medios sólidos y compost y es posible incrementar la concentración de este precursor de la vitamina D2.

Aprovechando el incremento en ergosterol como precursor de vitamina D2 y mediante el proceso de fotoconversión mediante tratamiento con luz ultravioleta se determinaron como afectan diferentes factores como el tipo de longitud de onda, la temperatura del tratamiento y el contenido en humedad de la biomasa tratada.

Las 3 longitudes de onda obtuvieron resultados de fotoconversión a vitamina D2 similares, siendo la UV-B (302nm) la que obtenía los mejores valores de conversión con 4,61 µg/g de p.s. y siendo esta la longitud de onda empleada en los estudios posteriores. Los valores óptimos de conversión para humedad y temperatura (79% de humedad con 15,03 µg/g de p.s. y temperatura 35°C con 22,53 µg/g de p.s.) se encuentran alejados de las condiciones habituales de trabajo en la industria (92,4% de humedad con 11,21 µg/g de p.s. y 15°C con 10,01 µg/g de p.s.).

Aunque algunos autores mencionan la aparición de un nivel *plateau* a largos tiempos de exposición (**Kalaras y col., 2012a**) en nuestros ensayos la tasa de conversión coincide con una línea de tendencia por lo que dicho valor *plateau* no ha sido alcanzado. Los máximos obtenidos a distintas temperaturas y contenidos en humedad manifiestan que poseen un impacto considerable sobre la tasa de conversión pero en las condiciones de trabajo habituales es posible obtener una concentración suficiente para cubrir la dosis diaria recomendada de vitamina D con una ración de 100g

Tras evaluar las mejores condiciones aplicables al modelo de producción y confirmar que es posible obtener una ración estimada de 100g de *A. bisporus* enriquecido con vitamina D que satisfaga la dosis diaria recomendada, se procedió a evaluar la seguridad mediante ensayos de toxicidad aguda y sub-cronica para descartar efectos adversos. Así mismo se realizaron ensayos sobre la bioaccesibilidad y biodisponibilidad para estimar el rendimiento de que proporción de la vitamina D2 obtenida en *A. bisporus* enriquecidos puede ser aprovechada por el organismo.

En los ensayos de toxicidad aguda y toxicidad sincrónica no se han podido demostrar efectos adversos en la salud de las ratas Wistar, ni en los parámetros bioquímicos, ni a nivel histocelular determinándose que no es posible detectar efectos adversos derivados de la toxicidad ante dosis prolongadas de 500mg/kg de peso corporal. Según la GHS, *A. bisporus* enriquecidos en Vitamina D2 no presentarían toxicidad en ratas Wistar y la DL50 no se ha podido determinar siendo superior al máximo valor ensayado de 5000 mg/kg de peso corporal.

Para la bioaccesibilidad se realizó una simulación *in vitro* del proceso de digestión cubriendo las diferentes etapas a las que se someten los alimentos hasta llegar al epitelio intestinal donde se produce la absorción. Dichas etapas de masticación, digestión salival, digestión gástrica, y digestión intestinal producen micelas que contienen la fracción de vitamina D2 bioaccesible para el epitelio intestinal.

La biodisponibilidad de estas micelas se comprobó *in vitro* evaluando que proporción de Vitamina D2 es capaz de atravesar una monocapa de células Caco-2 diferenciadas separando dos compartimentos. El compartimento apical simula la luz de intestino con la concentración inicial de micelas obtenidas de la digestión y en el compartimento basolateral se obtiene la fracción que ha atravesado la membrana y queda biodisponible en el organismo.

Los ensayos sobre bioaccesibilidad y biodisponibilidad indican que una fracción del 65% de la vitamina D2 obtenida queda bioaccesible en el modelo de digestión *in vitro* y que el 78% es capaz de atravesar la monocapa de células intestinales en el modelo de bioabsorción *in vitro*. Así es posible establecer que la relación entre ingesta de vitamina D2 de un alimento, en este caso champiñones enriquecidos en vitamina D y la dosis real aprovechable tiene un rendimiento del 50,8% en este tipo de ensayos.

Finalmente con los estudios realizados los objetivos propuestos quedan satisfechos, habiendo sido posible determinar que es posible modificar la concentración de ergosterol y otros compuestos bioactivos de interés mediante la modificación del medio de cultivo en medios líquidos, sólidos y en compost.

Que tras evaluar los factores que afectan al proceso de fotoconversión (Longitud de onda, Temperatura del tratamiento, Humedad y orientación) es posible obtener *A. bisporus* con contenidos en Vitamina D2 lo suficientemente elevados para satisfacer la dosis diaria recomendada de esta vitamina siendo posible considerarlos como un alimento funcional o como base de productos nutracéuticos.

Que no se ha podido determinar toxicidad o efectos adversos para la salud en ratas Wistar ni en dosis puntuales elevadas de hasta 5000 mg/kg de peso corporal ni en la exposición prolongada a dosis de 500mg/kg. Por ello y aunque son necesarios más estudios, la ausencia de toxicidad en *A. bisporus* enriquecido en vitamina D2 parece ser un factor esperanzador en su aceptación definitiva como alimento funcional y base para nutracéuticos. Y del mismo modo que dicha vitamina D2 se encuentra biodisponible y puede ser aprovechada para el organismo puede considerarse una opción apta y segura para prevenir el déficit de vitamina D.

...

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler-Nissen J (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers.
2. Aitken A. y Learmonth M. (1996). Quantification of tryptophan in proteins. En: The Protein Protocols Handbook, 2º edición. Editado por: Walker J.M. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
3. Akyüz, M. and Kirbag, S. (2010) Nutritive value of wild edible and cultured mushrooms. *Turkish Journal of Biology*, 34, 97-102.
4. Anderson L. and Seilhammer J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18, 533-537
5. A.O.A.C. 2006 Authors Official Methods of analysis
 - a. AOAC Official Method 934.01 Loss on Drying (Moisture) at 95–100C for Feeds Dry Matter on Oven Drying at 95–100C for Feeds First Action 1934
 - b. AOAC Authors. *Official methods of analysis Total Carbohydrates, crude 'by difference' Calculation: 100 percent minus percent (CP + Ash + Crude Fat + M) - item 85*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. NFNAP; PROX.
 - c. AOAC Official Method 977.20, 1977, **Separation of Sugars** in Honey, Liquid Chromatographic Method, JAOAC, 60, 838
 - d. AOAC Authors. *Official methods of analysis Proximate Analysis and Calculations Crude Fiber - item 11*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Procedure Ba 6a-05; CHO; FIB.
 - e. AOAC Authors. *Official methods of analysis Proximate Analysis and Calculations Beta-Glucan - item 10*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method 995.16; CHO; GLUCNB.
 - f. AOAC Authors. *Official methods of analysis Lipids, Fats and Oils Analysis Total Fat Animal Feed - item 16*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method **920.39**; NFNAP; LIPD; FA.
 - g. AOAC Authors. *Official methods of analysis Proximate Analysis and Calculations Total Nitrogen or Crude Protein (CP) - item 76*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method 990.03; NITR; NT.
 - h. AOAC Authors. *Official methods of analysis Amino Acids Analysis Complete Amino Acid Profile (AAP) - item 72*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method 982.30 E (a,b,c); NFNAP; NITR; AA.

- i. AOAC 2015.009: Estimation of **total Phenolic** content using the Folin-C assay. *Journal of AOAC international*. 98 (4), 1109-1110.
 - j. AOAC Authors. *Official methods of analysis Proximate Analysis and Calculations Ash Determination (Ash) Flour - item 49*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method 923.03 (32.1.05 or 14.006); NFNAP; MIN; ASH.
 - k. AOAC Authors. *Official methods of analysis Minerals Analysis Flame Emission Photometry Sodium, Potassium - item 54*. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, 17th edition, 2006. Reference data: Method 956.01; NFNAP; MIN.
6. Arya, S. P., Mahajan, M., and Jain, P. (1998). Photometric methods for determination of vitamin C. *Analytical Sciences*, 14, 889–895.
 7. Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, and Vitorica J, (1996) Molecular and Pharmacological Characterization of Native Cortical γ -Aminobutyric Acid_A Receptors Containing Both α 1 and α 3 Subunits. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27902–27911
 8. Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., and Ferreira, I. C. F. R. (2007a). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105, 140-145.
 9. Barros, L., Ferreira, M. J., Queirs, B., Ferreira, I. C. F. R., and Baptista, P. (2007b). Total phenols, ascorbic acid, beta-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413-419.
 10. Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008a). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2742- 2747.
 11. Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008b). Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, 111, 61-66.
 12. Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2008c). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3856-3862.
 13. Baron E. and Suggs A. (2014) introduction to photobiology. *Dermatologic clinics*. 32 (3), 255-266
 14. Bataille, P., Achard, J., Fournier, A., Boudailliez, B., Westeel, P., Esper, N., Bergot, C., Jans, I., Lalau, J., Petit J., Henon, G., Laval-Jeantet, M., Bouillon, R. and Sebert, J. (1991) Diet, Vitamin D and vertebral mineral density in hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney international*, 39, 1193-1205.
 15. Bauer-Petrovska, B. (2001). Protein fractions in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology*, 212, 469-472.

16. Bautista J., Corpas R., Cremades O., Hernandez-Pinzón I., Ramos R., Parrado J., Millan F., (2000). Sunflower protein hydrolysates for dietary treatment of patients with liver failure. *JAACS* 77, 121-126.
17. Bautista J., (2017). Informe del Proyecto CHAMPI-D (RTC-2015-4039-2), Ministerio de Economía y competitividad, Gobierno de España.
18. Bell, A.S. (2007) Major Antifungal Drugs. En: *Comprehensive Medicinal Chemistry II; Therapeutic Areas II: Cancer, Infectious Diseases, Inflammation & Immunology and Dermatology* 2º Edición. Editado por: Taylor J. y Triggler D. Editorial Elsevier Science.
19. Bellan, M., Pirisi, M. and Sainaghi P. (2015) Osteoporosis in rheumatoid arthritis: role of the vitamin D/parathyroid hormone system. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 55 (3) 256-263.
20. Bellettini, M., Fiorda, F., Maievas, H., Texeira, G., Ávila, S., Hornug, P., Júnior, A. y Ribani, R. (2019) Factors Affecting Mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (4), 633-646.
21. Berg, J., Tymoczko, J and Stryer, L. (2007) *Biochemistry*, 6th edition, New York: W.H. Freeman and Company, 650
22. Biancuzzo, R., Young, A., Bibuld, D., Cai, M., Winter, M., Klein E., Ameri, A., Reitz, R., Salameh W., Chen T. and Holick M. (2003) Fortification of orange juice with vitamin D2 or vitamin D3 is as effective as an oral supplement in maintaining vitamin D status in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(6), 1621-1626
23. Blackwell, M., Spatafora, J.W. (2004) *Fungi and their allies*. En: *Biodiversity of fungi*. 1º edición. Editado por: Mueller, G. y Foster, M. Editorial Academic Press.
24. Boa E. (2005). Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población. En: *Productos forestales no madereros*, N° 17. 1º Edición. Editado por: Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, (FAO), Roma.
25. Boomsma, F., Jacobs, H., Having, E. and Van der Gen, A. (1977) The “overirradiation products” of previtamin D and tachysterol: Toxisterols, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 96 (4) 104-112.
26. Bover, J., Egidio J., Fernández-Giráldez, E., Praga, M., Solozábal-campos, C., Torregrosa, J. and Martinez-Castelao, A. (2015) Vitamina D, receptor de la vitamina D e importancia de su activación en el paciente con enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 35 (1), 28-41.
27. Braaksma, A. and Schaap, D.J. (1996). Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology*, 7, 119-127.
28. Burris H., Rifas-Shiman, S., Huh, S., Kleinman, K., Litonjua, A., Oken E., Rich-Edwards, J., Camargo, C. and Gillman, M. (2014) Vitamin D status and hypertensive disorders in pregnancy. *Annals of epidemiology*, 24, 399-403.

29. Carbonero-Aguilar, P., Falcón-García, G., Gallego-Yerga, P., del Campo, J.A., Moreno, I. and Bautista, J. (2018) Preliminary Studies of the Toxicity of *Agaricus bisporus* Aqueous Enzymatic Extracts (AbAEE) in rats. *Journal of toxins*, 5(1), 1-7
30. Carneiro, A., Ferreira, I., Dueñas, M., Barros, L., da Silva, R., Gomes, E. and Santos-Buelga, C. (2013) Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*, 138, 2168–2173
31. Carrillo, C., Díaz, G. y Honrubia, M. (2004) Improving the production of ectomycorrhizal fungus micelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content *Engineering in Life Sciences*, 4, 1-3
32. Çaglarirmak, N (2007) The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* 105, 1188-1194.
33. Çaglarirmak, N. (2009) Determination of nutrients and volatile constituents of *Agaricus bisporus* (brown) at different stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 634-638
34. Carr, A., and Maggini, S. (2017) Vitamin C and Immune function. *Nutrients*. 9, 1211.
35. Carrillo J, Adenuga M, McKee R (2014) The sub-chronic toxicity of regular White Spirit in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, 222-230.
36. Cashman, K., Kinsella, M., McNulty, B., Walton, J., Gibney, J., Flynn, A., and Kiely, M. (2014) Dietary vitamin D2 – a potentially underestimated contributor to vitamin D nutritional status of adults? *British Journal of Nutrition*, 112, 193–202
37. Cashman, K., Dowling, K., Skrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., De Henauw, S., Moreno, L., Damsgaard, C., Michaelsen, K., Mølgaard, C., Jorde, R., Grimnes, G., Moschonis, G., Mavrogianni, C., Manios, Y., Thamm, M., Mensink, G., Rabenberg, M., Busch, M., Cox, L., Meadows, S., Goldberg, G., Prentice, A., Dekker, J., Nijpels, G., Pilz, S., Swart, K., van Schoor, N., Lips, P., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., Cotch, M., Koskinen, S., Lamberg-Allardt, C., Durazo-Arvizu, R., Sempos, C. and Kiely, M. (2016) Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103, 1033- 1044
38. Cepero de García, M., Restrepo-Restrepo, S., Franco-Molano, A., Cárdenas-Toquica, M., Vargas-Estupiñan, N., (2012) *Biología de Hongos*. 1º Edición, Editado por Universidad de los Andes. Departamento de Ciencias Biologicas.
39. Cipriani, C., Pepe J., Piemonte, S., Colangelo, L., Cilli, M. and Minisola S. (2014) Vitamin D and its relationship with obesity and muscle. *International Journal of endocrinology*, 2014:841248.
40. Cheung, P. (2008). *Mushrooms as Functional Foods*. 1º Edición Editado por: Cheung P. Editorial: John Wiley & Sons, Inc.
41. Cheung P. C. (2010) The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition bulletin*, 35 (4), 292-299.

42. Cheah, I. and Halliwell, B. (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822, 784–793.
43. Chihara, G. (1992). Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defense potentiator. *International Journal of Oriental Medicine*, 17, 57- 77.
44. Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., and Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99, 381-387.
45. Corrêa, R., Peralta, R., Bratch, A. and Ferreira, I. (2017) The emergin use of mycoesterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. *Trends in food Science and technology*, 67, 19-35.
46. Cremades de Molina, O., Diaz-Herrero, M., Carbonero-Aguilar, P, Gutierrez-Gil, J, Fontiveros-Heredia, E, Rodriguez-Morgado, B., Parrado, J. and Bautista J. (2012) Preparation and Characterisation of Selenium-Enriched Mushroom Aqueous Enzymatic Extracts (MAEE) Obtained from the White Button Mushroom (*Agaricus Bisporus*). *Food Chemistry*, 133(4) 1538-1543.
47. Cremades de Molina, O., Diaz-Herrero, M., Carbonero-Aguilar, P, Gutierrez-Gil, J, Fontiveros-Heredia, E. and Bautista, J. (2015) White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10, 42-47.
48. Delgado-Povedano MM, de Medina VS, Bautista J, Priego-Capote F, de Castro MD (2016) Tentative identification of the composition of *Agaricus bisporus* aqueous enzymatic extracts with antiviral activity against HCV: a study by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *Journal of Functional Foods* 24, 403-419.
49. Desai, I.D., Bhagavan, H., Salkeld, R. and Dutra de Oliveira, J.E. (1988) Vitamin E Content of Crude and Refined Vegetable Oils in Southern Brazil. *Journal of food composition and analysis*, 1, 231-238.
50. Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, F. B., and Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1-S28.
51. Dong, Z., Sun, Y., Wei, G., Li, S. and Zhao, Z. (2019) Ergosterol Ameliorates Diabetic Nephropathy by Attenuating Mesangial Cell Proliferation and Extracellular Matrix Deposition via the TGF- β 1/Smad2 Signaling Pathway. *Nutrients*, 11 (483), 1-18
52. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry*. 28(3) 350-356.
53. Espenshade, J. and Hughes, A. (2007) Regulation of sterol synthesis in Eucaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41, 401-427

54. Falandysz, J. (2008). Selenium in edible mushrooms. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 26, 256-299.
55. Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar, P., Cremades, O. and Bautista J. (2018) Effects of supplementation on the mycelial ergosterol content of *Agaricus bisporus* grown on media formulated with olive oil subproducts. *International Journal of Enviromental & Agriculture Research*, 4 (7), 36-44.
56. FAO (2003) Food energy – methods of analysis and conversion factors. Report of a technical workshop. *FAO Food and nutrition paper* 77. FAO Rome.
57. FAO/WHO, (2010) Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation, *FAO Food and Nutrition Paper*, 91. FAO, Rome.
58. FAO/WHO (2013) Dietary protein quality evaluation in human nutrition. *FAO Food and Nutrition Paper* 92, FAO, Rome.
59. Favell, D.J. (1997) A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*. 62, 59-64.
60. Feeney M.J., Miller A.M., Roupas P., (2014). Mushrooms – Biologically distinct and nutritionally unique: Exploring a “third food kingdom”. *Nutrition Today*, 49, 301-307.
61. Filoni, A., Vestita, M., Congedo, M., Giudice, G., Tafuri, S. and Bonamonte, D. (2018) Association between psoriasis and vitamin D: Duration of disease correlates with decreased vitamin D serum levels. an boservational study. *Medicine*, 97:25(e11185)
62. Fischer, J., Yoshimura, N., Aguirre A., James, J., Cummings, M., Aybel R. and Deindoerfer F. (1974) Plasma amino acids in patients with hepatic encephalopathy: effect of aminoacid infussions. *The American Journal of Surgery*, 127, 40-47.
63. Font Quer, P. (1958). Una historia de hongos. *Collectanea Botánica Vol. V, Fasc. III*. (31), 659-670.
64. Forman. J., Scott, J., Ng, K., Drake, B, Gonzalez-Suarez E., Hayden, D., Bennet, G., Chandler, P., Hollis, B., Emmons K., Giovannucci, E., Fuchs, C. and Chan, A. (2013) Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks. *Hipertension*, 61, 779-785.
65. Fox, J. D., and Robyt, J. F. (1991). Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Analytical Biochemistry*, 195, 93-96.
66. Fujihara, S., Kasuga, A., Aoyagi, Y., and Sugahara, T. (1995). Nitrogen-to-protein conversion factors for some common edible mushrooms. *Journal of Food Science*, 60 (3), 1045-1047.
67. Fujihara, S., Kasuga, A., Aoyagi, Y. (2001) Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Common Vegetables in Japan. *Journal of Food Science*, 66 (3), 412-415
68. Furlani, R. P. Z., and Godoy, H. T. (2008). Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 106, 816-819.

69. Gallego-Yerga P (2015) Estudio de la inhibición de la proteasa NS3 involucrada en la propagación del virus de la hepatitis C. Trabajo de Fin de Grado, facultad de Farmacia.Universidad de Sevilla.
70. Gao, H., Tan, T. (2003) Fed-Batch fermentation for ergosterol production. *Process Biochemistry*, 39, 345-350
71. García- Rollán, M. (2007) Cultivo de Setas y Trufas. 5º Edición. Editado por: García-Rollán. Editorial: Ediciones Mundi-Prensa.
72. García-Mancha, P. (2013) La historia del cultivo del champiñón en La Rioja 1º Edición. Editado por: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura Ganaderia y medio Ambiente.
73. García-Mendoza, C. (2000). Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 66,1-19.
74. Gil-Ramírez, A., Pavo-Caballero, C., Baeza, E., Baenas, N., Garcia-Viguera, C., Marín, F.R., Soler-Rivas, C. (2016). Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of Functional Foods*, 25, 1–13.
75. Gil-Ramirez A., Morales D. and Soler-Rivas C. (2018). Molecular actions of hypocholesterolaemic compounds from edible mushrooms. *Food & function*. 9 (1), 53-69.
76. Gründemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts A, Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A. and Schömig, E. (2005) Discovery of the ergothioneine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 102 (14), 5256-5261.
77. Gupta, R. Hollis, B., Patel, S., Patrick, K. and Bell, N. (2004) CYP3A4 is a Human Microsomal Vitamin D 25-Hydroxylase. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19 (4),680-688
78. Gygi, S., Rochon, Y., Franza, B. and Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 1720-1730
79. Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K. and Gomi, K. (2016) Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80 (9), 1667-1680.
80. Halliwell,B., Cheah, I. and Tang, R. (2018) Ergothioneine a diet derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBBS Letters*. 592, 3357-3366.
81. Hammond, J. B. W., Nichols, R. (1975). Changes in respiration and soluble carbohydrates during the post-harvest storage of mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, 835-842.
82. He, X., Zhang, B. and Tan, H. (2003) Overexpression of a Sterol C-24(28) reductasa increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 25, 773-778

83. He, X., Guo, X., Zhang, B. and Huarong, T. (2004) Effect of Overexpression of Sterol acyl Transferase on Fungosterol Production in Yeast Strains. *Acta Microbiologica Sinica*, 44 (1), 67-71
84. He, X., Guo, X., Liu, N. and Zhang, B. (2007) Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 55–60
85. Heany, P., Armas, L. and French, C. (2013) All-Source Basal Vitamin D Inputs Are Greater Than Previously Thought and Cutaneous Inputs Are Smaller. *The Journal of Nutrition*, 143 (5), 571-575.
86. Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. (2011) Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. *Food Science and Technology*, 44, 1343-1348.
87. Hess, J., Qi, W., Trevor, G. y Slavin, J., (2018). Impact of *Agaricus bisporus* Mushroom Consumption on Gut Health Markers in Healthy Adults. *Nutrients*, 10, 1402; 1-16
88. Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten-Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-47.
89. Holick, M. (2009) Vitamin D status: Measurement, Interpretation and Clinical application. *Annals of Epidemiology*. 19, 73-78.
90. Hollis, B., Kamerud, J.Q., Selvaag, S.R., Lorenz, J.D, Napoli, J.L. (1993) Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an ¹²⁵I-labeled tracer. *Clinical Chemistry*, 39 (3), 529-533.
91. Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., Zeng, B. (2017). Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Sacharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Microbiology*, 57 (3), 279-277
92. Imer, F., Aldemir, E., Kiliç H., Sonmezoglu, I. and Apak, R. (2008) The protective effect of amino acids on the Copper(II)- catalyzed autoxidation of ascorbic acid. *Journal of food and Drugs Analysis*, 16 (6), 46-53.

93. Iwalokun, B. A., Usen, U. A., Otunba, A. A., and Olukoya, D. K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6, 1732-1739.
94. Jakobsen, J. and Knuthsen, P. (2014) Stability of vitamin D in foodstuff during cooking. *Food chemistry*, 148, 170-175.
95. Jasinghe, V., Perrera, C. and Sablani, S. (2004) Kinetics of the conversion of ergosterol in edible mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 79, 864-869.
96. Jasinghe, V. and Perera, C. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92 (3), 541–546.
97. Jasinghe, V. and Perera, C. (2006) Ultraviolet Irradiation: The generator of vitamin D2 in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 95, 638-643.
98. Jaworska, G., Bernas, E. and Mickowska, B., (2011) Effect of production process on the amino acid content of frozen and canned *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Food Chemistry*, 125. 936–943
99. Jaworska, G. and Bernas, E. (2011b) Comparison of aminoacid content in canned *Pleurotus* and *agaricus bisporus* mushrooms. *Vegetable crops research bulletin*, 74, 107-115.
100. Jaworska, G., Bernas, E., Skrzypczak, A., Sidor, A., (2012) Tocopherols content in dry *Lactarius deliciosus* (l.: fr.) and *Cantarellus cibarius* (fr.) Pilei En: LABORALIM 2012 Zborník vedeckých prác. 1^o Edición, 156-159.
101. Jaworska, G., Pogón, K., Bernas, E. and Duda-Chodak, A. (2015a) Nutraceuticals and Antioxidant Activity of prepared for consumption commercial mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Food Quality*, 38, 111-122
102. Jaworska, G., Pogón, K., Skrzypczak, A and Bernas, E. (2015b) Composition and antioxidant properties of wild mushrooms *Boletus edulis* and *Xerocomus badius* prepared for consumption. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (12), 7944-7953
103. Jedidi, I.K., Ayoub, I.K., Philipe, T., and Bouzouita, N. (2016) Chemical composition and non-volatile components of three wild edible mushrooms collected from northwest Tunisia. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 5(3), 434-441
104. Jeurink, P., Noguera, C., Savelkoul, H., and Wichers, H. (2008). Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* 8, 1124-1133.
105. Jong, S. and Birmingham, J. (1993) Medicinal and therapeutic value of the Shiitake Mushroom, *Advances in Applied Microbiology*, 39. 153-184.
106. Kalaras, M.D., Beelman, R.B and Elias, R (2012a) Effects of postharvest Pulsed UV light treatment of white button Mushrooms (*Agaricus bisporus*) on vitamin D2 Content and quality attributes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 220-225

107. Kalaras, M.D, Beelman, R.B, Holick, M. and Elias, R. (2012b) Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Chemistry*, 135, 396–401
108. Kalaras, M.D., Richie, J.P., Calcagnotto, A., Beelman, R.B. (2017). Mushroom: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food Chemistry*, 233, 429-433.
109. Kalaç, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16.
110. Kalaç, P. (2013) A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 209–218
111. Katano H., Takakuwa M., Hayakawa H., Kimoto H., (2016). Determination of chitin based on the colorimetric assay of glucosamine in acid hydrolysate. *Analytical Science*, 32, 701-703
112. Kline, L. and Lemire, G. (1996). Field evaluation of heat as an added attractant to traps baited with carbon dioxide and Octenol for *Aedes taeniorhynchus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11. 454-6.
113. Kurzman, R. H. (1997). Jr. Nutrition from mushrooms, understating and reconciling available data. *Mycoscience* 38, 247-253.
114. Landrier, J. (2014) Vitamine D: Sources, métabolisme et mécanismes d'action. *Oilseeds & fat Crops and Lipids*. 21(3) D302
115. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
116. Larumbe, E. (2007). Estrategias push and pull de marketing en el sector de setas y champiñones. En: Propiedades saludables del consumo de champiñón. Actas de I Jornada sobre champiñón. Logroño, España, 63-78.
117. Lee, K-H., Morris-Natschke, S., Yang, X., Huang, R. Zhou, T., Wu, S-F., Shi, Q., Itokawa, H. (2012). Recent progress of research on medicinal mushrooms, foods, and other herbal products used in traditional Chinese medicine. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2 (2), 84-95
118. Li, X., Wu, Q., Xie, Y., Ding, Y., Du, W., Sdri, M and Yang, B. (2015) Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth *in vitro* and *in vivo* by up-regulating multiple tumor suppressors. *Oncotarget*, 6 (19) 17832-17846
119. Lim, H. W., Yoon, J. H., Kim, Y. S., Lee, M. W., Park, S. Y., and Choi, H. K. (2007). Free radical- scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake sing.*). *Food Chemistry*, 103, 1337-1342.
120. Lin, Y., Lee, B., Alagie, J. and Su, C. (2017) Combination treatment of ergosterol followed by amphotericin B induces necrotic cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 8 (42), 72727-72738.

121. Lumb, R. and Martell, A. (1953) Metal chelating tendencies of glutamic and aspartic acids. *The Journal of Physical Chemistry*, 57 (7), 690-693.
122. Maeda, S., Borba, V., Rodrigues-Camargo, M., Weber-Silva, D., Cunha-Borges, J., Bandeira, F. and Lazaretti-Castro, M. (2014) *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 58 (5), 411-433.
123. Manninen, H., Rotola-Pukkila, M., Aisala, H., Hopia, A. and Laaksonen, T. (2018) Free amino acids and 5-nucleotides in Finnish forest mushrooms. *Food Chemistry*, 247, 23–28.
124. Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., and Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84, 201-206.
125. Marcio, R. (2018) The Multifunctional Fungal Ergosterol. *American Society for microbiology*, 9 (5) 1-5.
126. Martel, J., Ko, Y-F., Ojcius, D.M., Lu, C-C., Chang, C-J., Lin, C-S., Lai, H-C., Young, J.D. (2017). Immunomodulatory properties of plants and Mushrooms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(11), 967-981.
127. Mathiew, C. (2015) Vitamin D and diabetes: where do we stand?. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 108, 201-209
128. Mattila P., Piironen V., Uusi-Ravua, E. and Koivistoinen P. (1994) Vitamin D content in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2449-2453.
129. Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., and Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2343-2348.
130. Mattila, P., Lampi, A. M., Ronkainen, R., Toivo, J., and Piironen, V. (2002a). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76, 293-298.
131. Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H., and Jalava, T. (2002b). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 50, 6419-6422.
132. Mau, J., Chen, P. and Yang J. (1998) ultraviolet irradiation increased vitamin D2 content in edible mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46 (12), 5269-5272.
133. Mau, J., Lin, H., and Chen, C. (2002). Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 6072-6077.
134. McCleary B., y Draga A., (2016). Measurement of β -glucan in mushrooms and mycelial products. *Journal of AOAC International* 99, 364-373.
135. Mehta, R.G and Mehta, R.R. (2002) Vitamin D and cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13, 252-264.

136. Mena-Bravo, A., Priego-Capote, F. and Luque de Castro M.D. (2015) Study of blood collection and sample preparation for analysis of vitamin D and its metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 879, 69-76
137. Millán-Rodríguez, F., Gavrilov P., Gracia-García S., Angerri-Feu, O., Sanchez-Martín F. and Villavicencio-Mavrich H. (2015), Implicaciones del déficit de vitamina D en el paciente litiásico y en la población general. *Actas Urológicas Españolas*. 39(4), 245-252.
138. Miyagawa, H., Umeda, M., Sato, T., Bando, S., Nakamura, S. and Goto T. (2009) Single-laboratory validation of a method of ergosterol determination in cereals. *Food Additives and Contaminants*, 26 (2), 201-206.
139. Mleckzek, M., Siwulsky, M., Rzymiski, P., Niedzielski, P., Gasecka, M., Jasinska, A., Budzynska, S. and Budka, A. (2017a) Multi-elemental analysis of *Lentinula edodes* mushrooms available in trade. *Journal of environmental Science and health, Part B*, 52(3), 196-205.
140. Mleckzek, M., Siwulsky, M., Rzymiski, P., Budzynska, S., Gasecka, M., Kalac, P. and Niedzielski, P. (2017b) Cultivation of mushrooms for production of food biofortified with lithium. *European Food Research and Technology*, 243, 1097-1104
141. Money N.P. (2016a). Are mushroom medicinal? *Fungal Biology*, 120, 449-453.
142. Money N.P. (2016b) Chapter 12 Fungi and Biotechnology. En: The Fungi 3^o Edición. Editado por: Watkinson, S., Boddy L. y Money, P., Academic Press.
143. Moore S., Spackman D.H. and Stein W.H., (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Analytical Chemistry*, 30, 1185-1190.
144. Moore, C., Murphy, M., Keast, D. and Holick, M. (2004) Vitamin D intake in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, 104 (6), 980-983.
145. Morton, N., Dickerson, A. and Hammond, J. (1985). Mannitol Metabolism in *Agaricus bisporus*: Purification and properties of mannitol dehydrogenase. *Journal of General Microbiology*, 131, 2885-2890.
146. Muszynska, B., Kala, K., Rojowski, J., Grzywacz, A. and Opoka, W. (2017) Composition and Biological properties of *Agaricus bisporus* fruiting bodies - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(3), 173-181
147. Nabors, M. (2016) Introducción a la Botánica 1^o Edición Editado por: Martín-Romo M. Pearson Addison Wesley, Pearson Educación, S.A.
148. Nestel, P. (2000) Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 228S-231S.
149. Nevoigt E, (2008) Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72 (3), 379-412.
150. Nicksic, M., Klaus, A., Argyropoulos, D. (2016). Chapter 22, Safety of Foods Based on Mushrooms. 1^o Edición En: Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods.

Editado por: Prakash, V., Martin-Belloso, O., Keener, L., Astley, S., Braun, S., McMahon, H. and Lelieveld, H. Academic Press.

151. Nikolovska-Coleska, Z., Dorevski, L., Klisarova, L., and Suturkova-Milosevic, L. (1995). Identification of phenolic constituents isolated from Macedonian propolis. *Bulletin of the Chemist and Technologist of Macedonia*, 14, 13-17.

152. Nishiyama, I., Yamashita, Y., Yamanaka, M., Shimohashi, A., Fukuda, T. and Oota T. (2004) Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 5472-5475.

153. Oliveira, C., Silva-Ferreira, A., De Freitas, V. and Silva, A. (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.

154. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, et al. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, 56-67.

155. Pan, J., Hu, C. and Yu, J. (2018) Lipid biosynthesis as an antifungal target. *Journal of fungi*, 4(50), 1-13

156. Pardo-Giménez A., Zied D.C., Álvarez-Ortí M., Rubiocan M., Pardo J.E., (2012). Effect of supplementing compost with grape seed meal on *Agaricus bisporus* production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92, 1665-1671.

157. Parrado, J., Millan, F., Hernández-Pinzón, I., Bautista, J., y Machado, A. (1993). Caracterización de hidrolizados enzimáticos de la proteína del girasol. *Diario de química agrícola y alimentaria* , 41 (11), 1821-1825.

158. Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Horst, R.L., Minor, B., Simon, R.R., Feeney, M.J. Byrdwell, W.C. and Haytowitz, D.B. (2011) Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7841–7853

159. Phillips, K.M., Horst, R.L., Koszewski N.J., and Simon R.R. (2012) Vitamin D4 in mushrooms. *PLoS One*, 7(8), e40702

160. Pludowski, P. Holick, M., Grant, W., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M., Haq, A., Povoroznyuk, V., Balatska, N., Barbosa, A., Karonova, T., Rudenka, E., Misiorowski, W., Zakharova, I., Rudenka, A., Lukaszewicz, J., Marcinowska-Suchowierska, E., Lazcz, N., Abramowicz, P., Bhattoa, H. and Wimalawansa, S. (2016) Vitamin D Supplementtion guidelines. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 175, 125-135

161. Polakowski t., Bastl R., Stahl U. and Lang C. (1999) Enhanced Sterol-acyl transferase activity promotes sterol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53, 30-35.

162. Poojary, M.M., Orlie, V., Passamonti, P. and Olsen, K. (2017a) Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 234, 236–244

163. Poojary, M.M., Orlie, V., Passamonti, P. and Olsen, K. **(2017b)** Improved extraction methods for simultaneous recovery of umami compounds from six different mushrooms *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 171–183
164. Porep, J., Walter, R., Kortekamp, A. and Carle, R. **(2014)** Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food Control*, 37, 77-84
165. Prange, A., Sari, M., von Ameln, S., Hajdu, C., Hambitzer, R., Ellinger, S. and Hormes, J. **(2019)** Characterization of selenium speciation in selenium-enriched button mushrooms (*Agaricus bisporus*) and selenized yeast (dietary supplement) using x-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 51, 164-168.
166. Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., and Somasundaram, R. **(2006)**. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9764-9772.
167. Rathore H., Prasad S. Sharma S. **(2017)**. Mushroom nutraceuticals for improve nutrition and better human health: A review. *Pharma Nutrition*, 5, 35-46.
168. Rathore, H., Sharma, A., Prasad, S. and Sharma, S. **(2018)** Selenium bioaccumulation and associated nutraceutical properties in *Calocybe indica* mushroom cultivated on Se- enriched wheat straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126 (4) 482-487
169. Raza M, Al-Shabanah O, El-Hadiyah T, Al-Majed A **(2002)** Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica* 70, 135-145.
170. Reis, F., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I. **(2012)**. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an interspecies comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 191–197.
171. Reis, F., Martins, A., Vasconcelos, H., Morales, P. and Ferreira, I. **(2017)** Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in food Science and technology*, 66, 48-62.
172. Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M., and Andrade, P. B. **(2006)**. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 8530-8537.
173. Rizzoli R., Boonen S., Brandi M.-L., Bruyère O., Cooper C., Kanis J.A., Kaufman J.-M., Ringe J.D., Weryha G., Reginster J.-Y., (2013). Vitamin D supplementation in elderly or postmenopausal women: a 2013 update of the 2008 recommendations from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Current Medical Research and Opinion*, 29 (4), 305-313,
174. Ross, C.A., Manson, J. E., Abrams, S.A., Aloia, J.F., Brannon, P.M., Clinton, S. K., Durazno-Arvizu, R.A., Gallagher, J.C., Gallo, R.L., Jones, G., Kovacs, C.S., Mayne, S.T., Rosen, C.J. and Shapses, S.A. **(2011)** The 2011 Report on Dietary reference intakes

for calcium and vitamin D from the institute of Medicine: What clinicians need to know. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96 (1), 53-58.

175. Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts. and Taylor, P. (2010) Mushrooms and agaritine: a minireview. *Journal of Functional Foods*, 2, 91-98.

176. Royse D.J. (2014). A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. En: *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Editado por: Singh, M., Editorial; ICAR-Directorate of Mushroom Research: Solan, India, 2014; pp 1–6.

177. Royse D.J. (2017) Chapter 2: Current Overview of mushroom Production in the world. En: *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*. Editado por: Cunha-Zied, D. y Pardo-Giménez, A. Editorial Wiley-Blackwell.

178. Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M. (2015) A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLOS One*, 10(6), e0130114

179. Rülh, M., Kües, U., (2007) Part VI Chapter 22: Mushroom production En: *Wood production, Wood technology and Biotechnological Impacts*. Editado por: Kües U. Universitätsverlag Göttingen, Umwelt Stiftung.

180. Saito, M. (2007) Role of FOSHU (Food for Specified Health Uses) for Healthier life. *Yakugaku Zasshi*, 127 (3), 407-416.

181. Sanchez-Escudero, Leyre (2016) Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares. Trabajo fin de grado. Universidad de Navarra

182. Santini, A., Cammarata, S.M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G.C., Pani, L. and Novellino, E. (2018) Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework. *British Journal of clinical pharmacology*, 84, 659-672.

183. Sarikurkcü, C., Tepe, B., and Yamac, M. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskişehir - Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresource Technology*, 99, 6651-6655.

184. Sato, F., Ouchi, Y., Okamoto, Y., Kaneki, M., Nakamura, T., Ikekawa, N. and Orimo, H. (1991) Effects of Vitamin D₂ analogs on calcium metabolism in vitamin D-deficient rats and in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Research in Experimental Medicine*, 191, 235-242.

185. Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Krings, U., Berger, R. and Hahn, A. (2011) Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of functional foods*, 3, 17-24

186. Shephard, S., Gunz, D. and Schlatter, C. (1995) Genotoxicity of Agaritine in the *lacI* transgenic mouse mutation Assay: Evaluation of the health risk of mushroom consumption. *Food and Chemical Toxicology*. 33 (4), 257-264.

187. Shie, A., Chun, R., Ma, C., Witzel, S., Meyer, B., Rafison, B., Swinkels, L., Huijs, T., Pepkowitz, S., Holmquist, B., Hewison, M. and Adams, J. (2016) Effects of High-Dose vitamin D2 versus D3 on total and free 25-Hydroxyvitamin D and Markers of calcium Balance. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 101(8), 3070-3078.
188. Simopoulos A. (2002) The importance of the ratio of Omega-6 /Omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
189. Simopoulos, A. (2004) Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, 20, 77-90.
190. Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A. & Rossi J A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
191. Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Yuksel, D., Arpin, N., Olivier, J. M., and Wichers, H. J. (1998). Analysis of *Agaricus bisporus* tyrosinase activation and phenolics utilization during *Pseudomonas tolaasii* or tolaasin-induced discolouration. *Mycological Research*, 102, 1497-1502.
192. Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J. M., and Wichers, H. J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 591-614.
193. Sonnleitner B, y Käppeli O, (1986) Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 927–937
194. Spolar, M. R., Schaffer, E. M., Beelman, R. B., and Milner, J. A. (1999). Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz[a]anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer letters*, 138, 145-150.
195. Stamets P. (2000) Growing gourmet and medicinal mushrooms 3^o Edición. Editado por: Stamets P. Ten Speed Press.
196. Stephan, A., Ahlborn, J, Zajul, M., Zorn, H., (2018). Edible mushroom mycelia of *Pleurotus sapidus* as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory test in comparison to commercial proteins and meat sausages. *European Food Research and Technology*, 244, 913-924
197. Stinco, C.M., Pumillia, G., Giuffrida, D., Dugo, G., Mendélez-Martinez, A.J. and Vicario, I.M. (2019) Bioaccessibility of carotenoids, vitamin A and α -tocopherol, from commercial milk-fruit juice beverages: Contribution to the recommended daily intake. *Journal of Food composition and Analysis*, 78, 24-32
198. Stoop J., Williamson J., Pharr D., (1996) Mannitol metabolism in plants: a method of coping with stress, *Trends Plant Science*, 1(5), 139-144.
199. Stuetz, W., Schlörmann, W. and Glei, M. (2017) B-vitamins, carotenoids and α -/ γ -tocopherol in raw and roasted nuts. *Food Chemistry*, 22, 222–227

200. Tajiri, K. and Shimizu, Y. **(2013)** Branched-chain amino acids in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 19 (43), 7620-7629.
201. Takamura, K., Hoshino, H., Sugahara, T. and Amano, H. **(1991)** Determination of vitamin D₂ in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 545, 201-204.
202. Takeuchi, A., Okano T., Teraoka, S., Murakami, Y. and Kobayashi, T. **(1984)** High Performance chromatographic determination of vitamin D in foods, feeds and pharmaceuticals by successive use of reversed-phase and straight-phase columns. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 30 (11), 11-25.
203. Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M. and Delpón, E. **(2007)** Lipid-Lowering therapy with statins, a new approach to antirhythmic therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 114, 107-126.
204. Tang, R., Cheah, I., Yew, T. and Halliwell, B. **(2018)** Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissue. *Scientific Reports - Nature*, 8, 1601
205. Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, et al. **(2002)** A 90- day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 179, 183-196.
206. Tortosa-Caparrós, E., Navas-Carrillo, D., Marín, F. and Orenes-Piñero, E. **(2017)** Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57 (16), 3421-3429.
207. Tressl, R., Barhi, D., Engel K.H. **(1982)** Formation of eight-carbon and ten-carbon components in Mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30, 89-93.
208. Tsai, S.H., Wu, T.P., Huang, S.J. and Mau, J.L. **(2007)** Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity *Food Chemistry*, 103, 1457–1464
209. Tsai, S.-Y., Huang, S.-J., Lo, S.-H., Wu, T.-P., Lian, P.-Y., and Mau, J.-L. **(2009)**. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 113, 578-584.
210. Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., and Gezer, K. **(2007)**. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101, 267-273.
211. Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J. and Morales, G., **(2014)** Functional foods, nutraceuticals and foshu: are we going to a novel food concept?. *Revista Chilena de Nutrición*, 41(2), 198-204
212. Vetter, J., **(2019)**. Biological values of cultivated mushrooms - a review. *Acta alimentaria*, 48(2), 229-240

213. Wachtel-Galor, S., Tomlinson, B., and Benzie, I. F. F. (2004). Ganoderma lucidum ("Lingzhi"), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *British Journal of Nutrition*, 91, 263-269.
214. Wagner, C., Taylor, S., Dawodu, A., Johnson, D. and Hollis, B. (2012) Vitamin D and Its Role During Pregnancy in Attaining Optimal Health of Mother and Fetus. *Nutrients*, 4, 208-230.
215. Wedad, M. and Hegazy, R. (2015) Vitamin D and the Skin: Focus on a complex relationship: A review. *Journal of advanced Research*, 6, 793-804.
216. Weeks, I., Beheshti, I., McCapra, F., Campbell, A.K. and Woodhead, J. S. (1983) Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. *Clinical Chemistry*, 29 (8), 1474-1479
217. Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64, 555-559.
218. Zitterman, A. (2003) Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?. *British Journal of Nutrition*, 89 (5), 552-572.

Normativa

- REGLAMENTO (CE) No 1924/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 404, 9-25
- Ley organica 17/2011 de 5 de Julio de 2011 de seguridad alimentaria y nutrición, BOE numero 160 (2011). *BOE núm. 160 del 5 de julio de 2011*, 71283-71319. BOE-A-2011-11604, páginas: 71283 a 71319

Patentes

- Patente Japonesa 2002 – Drinks consisting of extracts of Fomes japonicus extracted with honey and vinegar. 6841187. Sumihara, K. Ishikawa, T. www.freepatentsonline.com/6841187.html
- Patente usa 2004 – Food composition and methods of preparing the same. US7067146B2. Tom Grahn. <https://patents.google.com/patent/US7067146>

Bases de datos y recursos online.

- Diseño de moléculas - <http://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/draw.es.htm>
- ExPASy <https://www.expasy.org/>
- FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#search/mushrooms%20and%20truffles>

- FAO/WHO <http://www.fao.org/ag/humannutrition/nutrition/63160/es/>
- ImageJ software <https://imagej.nih.gov/ij/>
- KEGG <https://www.genome.jp/kegg/>
- USDA. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>
- TOXNET Database. <https://toxnet.nlm.nih.gov/>
- Centro de Investigación de Endocrinología y Nutrición Clínica de la Universidad de Valladolid. www.ienva.org
<http://www.ienva.org/web/index.php/es/dietas-para-los-pacientes/86-dietas-para-los-pacientes/dietas-para-los-pacientes/1087-dietas-deficit-nutricionales>

